



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

**“OPTIMIZACIÓN DE FORMULACIÓN Y EXTENSIÓN
DE VIDA DE ANAQUEL CON ANTIMICROBIANOS
NATURALES DE UN PRODUCTO
GEL-EMULSIFICADO DE CALAMAR GIGANTE”**

Por:

Vida Mariel López Peñuelas

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Enero 2013

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Vida Mariel López Peñuelas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del programa de Maestría en Ciencias de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal.



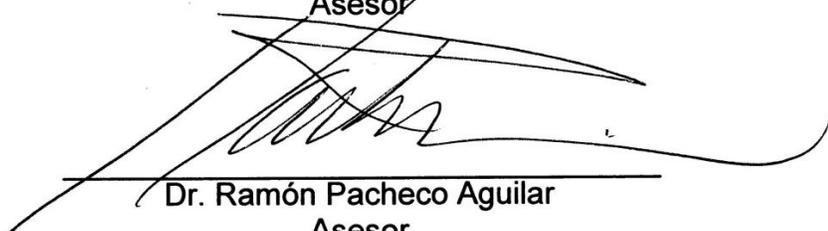
M.C. María Elena Lugo Sánchez
Director de Tesis



M en C Libertad Zamorano García
Asesor



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez
Asesor



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Asesor



Dr. Humberto González Ríos
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para efectuar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.); en especial a la CTAOA, por permitirme formar parte de sus estudiantes de posgrado y permitirme efectuar este trabajo.

A Fundación Produce Sonora, A. C., por el apoyo otorgado para efectuar esta investigación.

Muy agradecida con mi directora tesis M.C. María Elena Lugo Sánchez, siempre estuvo ahí atenta, impulsándome hasta donde le era posible, mostrándome su sencillez al compartir sus conocimientos, por todo ese tiempo invertido, pero sobretodo quiero destacar mi admiración por su calidad humana ¡MUCHISIMAS GRACIAS!

Una de las partes medulares para poder efectuar esta investigación fue sin duda el comité de tesis, me considero afortunada por haber sido asesorada por miembros tan activos que en todo momento mostraron la mejor disposición para que la investigación se desarrollara.

M.C. Libertad Zamorano, por involucrarse de principio a fin en este trabajo, por su entusiasmo al momento de asesorarme, por hacerme sentir su amiga más que su alumna.

Dr. Humberto González Ríos, por su orientación en cada una de las etapas de investigación, porque siempre buscó la forma de transmitir sus conocimientos de la manera más sencilla posible.

Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, por sus aportaciones y observaciones durante toda la investigación, pero sobretodo porque fue el primero que me abrió las puertas dándome la oportunidad realizar un verano científico donde me surgió la idea de realizar este posgrado

Dr. Ramón Pacheco Aguilar, por su apoyo y valiosos comentarios en pro de este trabajo.

A la Dra. Susana María Scheuren, un agradecimiento especial por estar siempre inmersa en la investigación, por su paciencia, confianza, por las múltiples atenciones dentro y fuera, por su sencillez ¡Mil gracias!

Al grupo de pesqueros a M en C. Guillermina García, M. en C. Gisela Carvallo Ruiz, Dra. Teresa Gollas, Dra. Celia Sifuentes y Dr. Marcel Martinez. En especial a la maestra Guille y Gisela por su apoyo profesional y personal, cada una con personalidades diferentes pero que coinciden en esa gran calidad humana. Maestra Guille, por su disponibilidad, consejos, por transmitir ese amor de madre, muchas gracias. Maestra Gisela, por sus enseñanzas, por estar siempre preocupada porque todo ocurra de manera justa y generar un ambiente de trabajo armonioso, muchas gracias. A Dra. Celia Sifuentes, por su apoyo en el congreso de IFT.

A I.Q. Germán Cumplido, por su valioso apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

M. en C. Luis Enrique González, por su disposición durante la realización de las evaluaciones de grasa en el golfish.

A mis compañeros I.B.Q Julio Cesar López Romero, M.C Nidia Valenzuela y Nayelli Gallardo, porque en su estancia en el grupo de pesqueros recibí su apoyo para el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos y compañeros: Ana Gloria Villalba, Cynthia Barrón, Dolores Figueroa, Marco Santiz, Pedro Serna, Gregorio Polloreña, Aristeo Villalobos,

Hugo Ramírez, Aarón Salazar, Angélica, Gabriel Fuente y Carlos Sotelo, por brindarme su amistad y enseñanzas, que de alguna forma contribuyeron para llevar a cabo este trabajo.

A toda mi hermosa familia: mi papá Víctor López, mi mamá Silvia Peñuelas; mi hermana Silvia Raquel, mi hermana Perla Jazmín y a mi novio Hugo Ruíz, todo su apoyo siempre se ve reflejado en cualquier etapa de mi vida. A mis sobrinos Silvia Elena y Víctor Francisco, porque aun estando lejos lograron transmitirme esa alegría impulsándome a seguir adelante.

A mi cuñado Saúl Barrios y mi hermana Perla, un agradecimiento especial por acogerme en su hogar, por vivir de cerca esta etapa tan importante de mi vida, por sus consejos, por ese inmenso amor que lograron transmitirme ¡GRACIAS!

DEDICATORIA

A mis papis:

Por que definitivamente ese amor incondicional que me brindan es lo que ha permitido que este concluyendo éste capítulo tan importante en mi vida, son un ejemplo de honestidad y perseverancia. Ustedes se han encargado de impulsarme, de dejarme claro que nunca hay que desanimarse cuando deseas algo aun cuando el panorama no nos favorezca, que la dedicación y trabajo diario nos llevarán al éxito.

A mi novio:

Porque a pesar de que la realización de este trabajo implicaba la distancia y sacrificar la convivencia diaria a la que estábamos acostumbrados, lo tomaste de la mejor manera apoyándome en la medida que te era posible, transmitiéndome esa actitud positiva, haciéndome ver que todo sacrificio tiene su recompensa, haciéndote presente cuando más lo necesitaba pero sobretodo por todo ese eterno amor que durante estos 8 años que llevamos juntos no ha permitido y estoy segura nos seguirá permitiendo llegar lejos.

LOS AMO, ¡GRACIAS!

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiv
RESÚMEN.....	xvi
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	3
Pesquería del Calamar Gigante	3
Biología de Calamar Gigante.....	4
Composición Química de Músculo de Calamar Gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	5
Propiedades Funcionales de Músculo de Calamar Gigante	5
Solubilidad.....	6
Capacidad de Retención de Agua (CRA)	7
Gelificación Térmica	8
Emulsificación	9
Productos Comerciales de Calamar Gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	10
Elaboración de Nuevos Productos Emulsificados a Partir de Calamar	10
Uso de Antimicrobianos Naturales para Extender la Vida de Anaquel de Productos Emulsificados	12
Nisina	12
Aceites Esenciales	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Etapa I: Optimización de la Formulación de Salchicha de Calamar	21
Formulación.....	21

CONTENIDO (*Continuación*)

	Página
Elaboración del producto.....	23
Análisis de Producto Terminado.....	25
Diseño de experimentos.....	28
Etapa II: Elección de Antimicrobiano Natural.....	32
Tratamientos	32
Evaluaciones	33
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	33
Etapa III: Evaluación de la Vida de Anaquel.....	34
Evaluaciones	34
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
Etapa I: Optimización de la Formulación de Salchicha de Calamar	36
Análisis Proximal	36
Análisis Sensorial	43
Elección de los Modelos Predictivos	45
Respuesta Óptima.....	54
Validación del Modelo Predictivo.....	54
Conclusiones Etapa I	59
Etapa II: Elección de Antimicrobiano Natural.....	60
Composición Proximal.....	60
Evaluación Microbiológica	62
Evaluación Físico-química de las Salchichas.....	65
Conclusiones Etapa II	69
Etapa III: Vida de Anaquel de Salchicha de Calamar	70
Composición Proximal.....	70
Evaluación de pH	70
Evaluación de Actividad de Agua (a_w).....	74
Evaluación de Capacidad de Retención de Agua	74
Evaluación de Textura.....	77

CONTENIDO (*Continuación*)

	Página
Análisis de Color	82
Evaluación Microbiológica de Crecimiento de Mesófilos y Psicrófilos	85
Crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas.	85
Coliformes Totales	89
Microorganismos Patógenos	89
Análisis Sensorial	93
Conclusiones Etapa III	97
CONCLUSIÓN GENERAL.....	98
BIBLIOGRAFÍA.....	99
ANEXO 1	110
ANEXO 2.....	114
ANEXO 3.....	115
ANEXO 4.....	116
ANEXO 5.....	117
Formato Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa I	117
Formato (a) Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa III.....	118
Formato (b) Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa III.....	119

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Proceso general de elaboración de salchicha de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).	24
2	Gráfica de superficie de respuesta del efecto de Almidón y Soya sobre el contenido de proteína de las salchichas de calamar.	47
3	Gráfica de superficie de respuesta para las variables fisicoquímicas. Efecto de almidón y soya sobre la CRA (a) y la dureza (b).	50
4	Gráfica de superficie de respuesta para las variables fisicoquímicas. Efecto de almidón y soya sobre Esfuerzo al corte (a) y Prueba de Doblado (b).	51
5	Gráfica de superficie de respuesta para la evaluación sensorial. Efecto de almidón y soya sobre la textura al masticar.	53
6	Perfiles de predicción de respuesta óptima para los niveles de almidón y soya en los puntos centrales para proteína, EC y textura al masticar.	55
7	Perfiles de predicción de respuesta óptima para los niveles de almidón y soya en los puntos centrales para dureza, CRA y PD.	56
8	Comportamiento de las bacterias mesófilas (media + error estándar de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento.	63
9	Cambios en la población de bacterias psicrófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	64

LISTA DE FIGURAS (*Continuación*)

<i>Figura</i>		Página
10	Cambios en la población de bacterias ácido lácticas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	66
11	Porcentaje de pH (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	67
12	Actividad de agua (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	68
13	Cambios en el contenido de humedad (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).	72
14	Cambios en el pH (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).	73
15	Cambios en actividad de agua (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).	75
16	Porcentaje de capacidad de retención de agua (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).	76
17	Valores de dureza (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración (0-4 °C).	78
18	Porcentaje de cohesividad (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	79
19	Valores de esfuerzo al corte (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración (0-4 °C).	81

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

<i>Figura</i>		Página
20	Cambios en la población de bacterias mesófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	86
21	Cambios en la población de bacterias psicrófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	87
22	Cambios en la población de bacterias ácido lácticas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	88
23	Cambios en la población de Coliformes Totales (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	90
24	Cambios en la población de coliformes fecales (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.	91
25	Evaluación sensorial de diferencias contra el control en salchichas de calamar durante el almacenamiento en refrigeración (2-4°C) durante 21 días.	94
26	Evaluación sensorial de aceptación y rechazo en salchichas de calamar con nisina 8 ppm durante el almacenamiento en refrigeración (2-4°C) del día 28 al 40.	95
27	Proceso de elaboración de salchicha de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).	110

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Capacidad emulsionante de proteínas alimentarias	9
2	Niveles de aplicación de nisina y Nisaplin® en alimentos	15
3	Ingredientes y proporciones utilizadas de formulación de salchicha de calamar.	22
4	Especificaciones de tiempo y temperatura del proceso de cocción de salchicha de calamar.	26
5	Escala de puntos para la prueba de doblado.	29
6	Corridas experimentales del diseño central compuesto rotatorio para dos factores (2^2).	31
7	Composición proximal de las diferentes formulaciones de salchicha de calamar gigante.	37
8	Características fisicoquímicas de las formulaciones de salchicha de calamar gigante.	39
9	Parámetros de color interno y externo de las distintas formulaciones de salchicha de calamar gigante.	42
10	Calificaciones promedio de los atributos sensoriales de formulaciones de salchichas de calamar gigante.	44
11	Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para el análisis proximal de las salchichas de calamar gigante.	46
12	Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para las características fisico-químicas de las salchichas.	48
13	Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para la evaluación sensorial de las salchichas.	52

LISTA DE TABLAS (*Continuación*)

Tabla		Página
14	Valores predichos y experimentales del modelo.	57
15	Composición proximal de formulaciones de salchicha de calamar por efecto del antimicrobiano.	61
16	Composición proximal de formulaciones de salchicha de calamar.	71
17	Cambios de color interno de formulaciones de salchicha de calamar	83
18	Cambios de color externo de formulaciones de salchicha de calamar	84
19	Microorganismos patógenos en formulaciones de salchicha de calamar.	92

RESUMEN

Estudios previos demostraron factibilidad tecnológica de elaborar un producto gel-emulsificado de músculo de calamar gigante. Sin embargo, requiere una formulación óptima, con características similares a las de un producto comercial y de vida de anaquel extendida. La industria alimentaria ha utilizado un gran número de conservadores artificiales en la prevención del crecimiento microbiano. Sin embargo, en la actualidad y en respuesta a un nicho comercial se buscan alimentos más naturales. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la formulación de un producto gel-emulsificado de músculo de calamar gigante y prolongar sus características de calidad y vida de anaquel en refrigeración a 4°C con antimicrobiano natural. Se evaluaron tres etapas: Etapa I: optimización de la fórmula mediante metodología de superficie de respuesta (MSR) con arreglo factorial 2^2 , modificando la concentración de almidón (X_1) y soya (X_2), las variables de respuesta fueron composición proximal, calidad físico-química y sensorial. Etapa II: Se evaluaron dos antimicrobianos naturales sobre la fórmula optimizada y almacenada a 4°C, con los tratamientos de: control (sin antimicrobiano), nisina 5 y 8 ppm y Citrol-K Ultra® 375 y 500 ppm; se monitoreó pH, a_w , y análisis microbiológicos. Etapa III: Evaluación de la calidad físico-química, sensorial y microbiológica en refrigeración, con nisina 8 ppm (Etapa II). Los resultados de la Etapa I mostraron modelos significativos ($P < 0.05$) para las variables: proteína (9.71%), CRA (94.34%), dureza (1.83 kg_F/g), EC (0.1 kg_F/g), textura al masticar (6.53 puntos) y prueba de doblado (4.48), y las soluciones óptimas de las variables anteriores se ubicaron en los puntos centrales del diseño experimental. En la Etapa II, las concentraciones de nisina y Citrol-K Ultra® no tuvieron efecto ($P > 0.05$) en pH; sin embargo, si mostraron diferencias ($P < 0.05$) en a_w (0.96) con respecto al control (0.97)

durante el almacenamiento. Los análisis microbiológicos reflejaron que nisina a 8 ppm fue el antimicrobiano más efectivo tanto en mesófilos, psicrófilos y BAL durante el almacenamiento. En la Etapa III, los resultados de pH (6.48 vs 6.34), a_w (0.97 vs 0.93), CRA (95.29% vs 94.17%), EC (0.13 kg_F/g vs 0.11 kg_F/g) y el parámetro de color a^* (interno y externo), mostraron diferencias ($P < 0.05$). El tratamiento (40 días) vs control (21 días) mostraron diferencias ($P < 0.05$) en la evaluación microbiológica paralelo con la aceptación sensorial. Nisina a 8 ppm puede ser utilizado en productos gel-emulsificados para extender su almacenamiento en refrigeración hasta 40 días, sin afectarlo físico-química y sensorialmente.

Palabras clave: optimización, calamar gigante, antimicrobianos naturales, nisina, Citrol-K Ultra®, vida de anaquel.

ABSTRACT

Previous research has shown technological feasibility in developing a jumbo squid gel-emulsified product. However a formula optimization is required including similar characteristics to those from commercial product and extended shelf life. The food industry has used a large number of artificial preservatives to prevent microbial growth. However, at present time and in response to a market niche natural foods are sought. The aim of this study was to optimize the formulation of a giant squid gel-emulsified product, extend its quality characteristics and shelf life under refrigeration conditions (4°C). Three stages were evaluated: Stage I: The formula optimization through response surface methodology (RSM) with factorial arrangement 2^2 , by modifying the starch (X_1) and soybeans (X_2) levels, the response variables were proximate composition, physical-chemical quality and sensorial analysis. Stage II: Two natural antimicrobials were evaluated on the optimized formula, and stored at 4°C, with treatments: control (no antimicrobial), 5 and 8 ppm nisin and 375 and 500 ppm of Citrol-K Ultra®; pH, a_w and microbiological analysis were monitored. Stage III: Evaluation of physico-chemical, sensory and microbiological parameters under refrigeration, with nisin 8ppm (Stage II). The results of the part I showed significant models ($P<0.05$) for the variables: protein (9.71%), water holding capacity (94.34%), hardness (1.83 kg_F/g), shear force (0.1 kg_F/g), chewing texture (6.53 points) and folding test (4.48), and the optimal variables stood at the central points of the experimental design. In Stage II, the concentrations of nisin and Citrol-K Ultra® had no effect ($P<0.05$) on pH; however, there were differences ($P<0.05$) in a_w (0.96) compared to control (0.97) during the storage. Microbiological counts were affected by the treatments ($P<0.05$), and 8 ppm nisin was more effective to control mesophiles, psychrophiles and ALB during

the storage. In Stage III, the results of pH (6.48 vs 6.34), a_w (0.97 vs 0.93), water holding capacity (95.29% vs 94.17%), shear force (0.13 vs 0.11 kg_F/g) and a^* color parameter (internal and external) showed differences ($P < 0.05$). There were differences ($P < 0.05$) among treatment (40 days) vs control (21 days) from microbiology perspective alongside to sensory acceptance. The results show that nisin to 8 ppm can be used in this kind of products to extend shelf life until 40 days under refrigeration without affecting physical-chemical and sensorial characteristics to the product.

Keywords: optimization, jumbo squid, natural antimicrobials, nisin, Citrol-K Ultra®, storage.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es un recurso con un potencial innovador en México, sus características nutritivas y bajo precio lo ubican como alimento alternativo de gran valor comercial. En 2012, la producción de calamar en México ocupó el 7^{mo} lugar de acuerdo al volumen de captura y el 17^{vo} lugar del valor económico de su pesquería (CONAPESCA, 2012). La captura y procesamiento del calamar gigante ha sido una actividad positiva como factor generador de empleos, siendo Sonora, la entidad más beneficiada; sin embargo, el consumo de esta especie es muy limitada en el país (De la Cruz et al., 2006). La poca aceptación a nivel nacional se ha asociado al desconocimiento de la especie, a su sabor característico ácido-amargo y formas de preparación, así como también a que se comercializa como producto de poco valor agregado: manto, filete fresco o fresco-congelado (Luna-Raya et al., 2006; CONAPESCA, 2010). Variantes comerciales a nivel nacional, está la del calamar enlatado en presentaciones como, calamar en su tinta y productos imitación abulón (Luna-Raya et al., 2006).

Por otro lado, las nuevas tendencias del consumidor se inclinan al mercado de productos naturales. En este tenor, la biopreservación a través de productos antimicrobianos (ácidos, bacteriocinas, aceites esenciales etc.) han sido usados con gran éxito para extender el tiempo de almacenamiento e inocuidad de productos alimenticios, incluyendo los de origen marino (Hugas, 1998; Raju et al., 2003; Hammou et al., 2010).

Entre los antimicrobianos conocidos y estudiados en productos emulsificados está la nisina, producido por bacterias ácido lácticas (LAB), con característica "GRAS" por sus siglas en ingles (Generally Recognised as Safe) y

único aprobado como aditivo alimentario en Europa y Estados Unidos. La nisina presenta actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias Gram positivas, las cuales representan la microbiota deteriorativa preponderante para este tipo de productos (Hurst, 1981; Delves-Broughton et al., 1990). Por otro lado, se ha observado que las bacterias Gram positivas y Gram negativas son sensibles a los componentes de los extractos de aceites esenciales cítricos (O'Bryan et al., 2008; Fisher y Phillips 2006) como el Citrol-K Ultra®, representando otra opción natural con gran versatilidad de aplicaciones.

Paralelamente, el Gobierno de México y Sonora, en conjunto con la secretaria de Educación (SEP) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), buscan promover y apoyar esfuerzos para programas de alimentación más sana a nivel escolar, así como también impulsar la promoción y uso de especies nativas subutilizadas en México (Calamar, sardina, etc.).

Atendiendo esta problemática, el grupo de control de calidad de productos pesqueros (LByCPP) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) demostraron la factibilidad tecnológica de obtener productos gelificados-emulsificados tipo salchichas (frankfurter) de buena calidad a partir de manto de calamar gigante; sin embargo el producto reflejó una vida de anaquel muy corta como resultado de factores fisicoquímicos y microbiológicos (Félix-Armenta et al., 2009).

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue optimizar la formulación de un producto gel-emulsificado de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y prolongar sus características de calidad y vida de anaquel en refrigeración a 4°C con la incorporación de dos antimicrobianos naturales. De esta manera se espera generar un producto de calidad, con una vida de anaquel prolongada y de competencia comercial nacional y/o internacional, así como también aportar opciones nutritivas para la incorporación a la lista de escolares.

ANTECEDENTES

Pesquería del Calamar Gigante

Tanto en el Golfo de California como en el Pacífico Mexicano, el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) ha sido uno de los productos pesqueros que más ha llamado la atención debido su abundancia en este sector pesquero, además de poseer un bajo valor comercial para el productor que desee generar productos a base de esta materia prima. El centro del Golfo de California, región que comprenden los estados de Baja California Sur, parte de Sonora y Sinaloa, representa la región geográfica con mayor captura de calamar del país, ya que esta producción se ve influenciada y favorecida por factores climáticos, ambientales y alimenticios de la especie (Rivera-Parra, 2001).

Al 2012 el calamar se encuentra posicionado en el lugar 7 por el volumen de producción de especies marinas en México; sin embargo por su valor comercial, lo encontramos en el lugar 17 (CONAPESCA, 2012). Durante los últimos 10 años la tasa media de crecimiento anual de la producción presentó una tendencia negativa (-11.30%) debido a que es una especie de captura intermitente ocasionada por diversos factores en su desarrollo y reproducción (CONAPESCA, 2012). De manera comparativa de acuerdo a cifras preliminares en el periodo Enero-Agosto 2011-2012, se observa mayor volumen (15.34%) de producción para el presente año sin embargo, su valor de venta disminuye en un 18.93%.

En las exportaciones se encuentra en el lugar número 8 de las especies marinas, siendo China, Filipinas y Corea, sus principales destinos. El calamar contribuye en un 28.06% en la participación porcentual de la producción de

exportación de especies marinas en el estado de Sonora (CONAPESCA, 2012).

Según las estadísticas mostradas por la Secretaría de Economía del Servicio Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM), el precio promedio al mayoreo y menudeo de productos pesqueros comercializados de calamar fresco o congelado al 2009 es de \$13.73 (mayoreo) y \$20.50 (menudeo) por kilogramo (CONAPESCA, 2010). Aunque el precio del calamar gigante se ha acrecentado un 144% desde el año 2002, el costo por kilogramo actualmente no excede los 21 pesos (CONAPESCA, 2010). Esto se asocia a su pobre aceptabilidad entre los consumidores, principalmente por el limitado conocimiento del producto y al sabor ácido-amargo que caracteriza a su músculo, como lo sustentan estudios de Sánchez-Brambrila et al. (2004).

Biología de Calamar Gigante

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es uno de los ommatridios más grandes y abundantes (Nigmatullin et al., 2001). Esta especie registra una alta tasa de crecimiento y su ciclo de vida no supera los 24 meses; alcanza una longitud de manto de 100-120 cm y registra un peso de hasta 30-50 kg (Nigmatullin et al., 2001). El calamar gigante tiene dos aletas romboidales que representan el 49-65% de la longitud de manto (LM); la característica más notable es tal vez, la prolongación de los extremos distales de los brazos en filamentos largos y delgados, conteniendo entre 100 y 200 pares de ventosas diminutas muy agrupadas (Markaida, 2001).

Cuando la dieta es escasa, puede llegar a practicar el canibalismo incluso migrar, lo cual es una conducta común dentro de los cefalópodos, estos nadan siguiendo las temporadas de afloramiento costero (Markaida y Sosa, 2003; Bazzino et al., 2010). Según el estudio de Robinson et al. (2013) la captura de calamar se ha mostrado intermitente, señalan que en el periodo de junio de 1999 a diciembre de 2004 se realizaron altas capturas pero específicamente en el 2003-2004 se presentaron las máximas, sin embargo

desde enero de 2005 a la fecha hay una disminución progresiva y marcada registrando los últimos seis meses como los más bajos durante los últimos 15 años. Todas estas variaciones en la captura las relacionaron a temperaturas frías y a las altas concentraciones de clorofila, pero se cree que con las nuevas tecnologías de pesca se puedan ayudar para explotar nuevas áreas de captura (Robinson et al., 2013).

Composición Química de Músculo de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

La porción comestible del calamar gigante, está integrada principalmente por el manto, brazos y tentáculos. Esta fracción, representa del 80-85 % de su peso corporal, siendo mayor que en otras especies marinas, debido a que es un organismo invertebrado. El manto, es la parte más representativa de la fracción comestible, ya que su fracción en peso es del 53-56 % con respecto al peso total.

La composición química de las especies marinas varía dependiendo de algunos factores como son: sexo, tamaño, alimentación, localización y temporada de captura, entre otros factores. El calamar gigante no es la excepción y las diferencias pueden deberse a la localización y/o temporada de captura, así como a la talla (Velázquez-Abunader et al., 2010).

El calamar puede ser considerado como un alimento muy completo ya que la composición química del manto es similar a la de los pescados magros. El músculo de calamar, se constituye en mayor proporción de agua (83-86%) y proteína (8.9-14.5%); y posee en menor proporción carbohidratos, cenizas y grasas (Ezquerro-Brauer et al., 2002; Cortés-Ruiz et al., 2008).

Propiedades Funcionales de Músculo de Calamar Gigante

Se entiende por propiedad funcional de las proteínas, aquellas características no nutricionales, es decir, características físicas y químicas, que modifican las características reológicas y de textura de los alimentos, mejorando así su

calidad (Dergal, 1993). En este sentido las proteínas representan la parte funcional más importante en carne cruda, procesada de los productos cárnicos (Kijowski, 2001). Las propiedades funcionales de mayor importancia de las proteínas musculares son: solubilidad, capacidad de retención de agua, emulsificación y gelificación.

Solubilidad

Se sabe que cambios en la solubilidad de proteína pueden ser obtenidos variando el pH de la solución; tal es el caso de los procesos ácido y alcalino. Las proteínas adquieren una carga neta negativa o positiva donde resultará una repulsión entre ellas y una hidratación de los residuos cargados, provocando así, un incremento de la solubilidad (Damodaran, 1996). Por debajo del punto iso-eléctrico (pI) las proteínas presentarán carga neta positiva y por arriba de este tendrán carga neta negativa. En el momento en que el pH es ajustado cerca del pI se reducirán las fuerzas de repulsión y permitirán que se agreguen entre ellas (Vojdani, 1996). La influencia del pH sobre las propiedades funcionales de las proteínas es de fundamental importancia, el pH al cual la funcionalidad de una proteína es mínima está en el rango de 5.1-5.3, debido a que en este pH la carga neta de la proteína es cero (Punto isoeléctrico, pI), originando la agregación de la proteína y con ello su precipitación y falta de funcionalidad (Badui, 1999).

En función de la fuerza iónica las sales pueden solubilizar o precipitar a las proteínas. En los sistemas cuya concentración es menor de 1M, las proteínas incrementan su solubilidad mediante la solubilización por salado (salting-in). Tanto los cationes como aniones reaccionan con los grupos ionizables del polímero y evitan que éste se asocie, por atracciones electrostáticas con otros de su misma especie. Además, los iones salinos, tienen la capacidad de hidratación y provocan un aumento de la cantidad de agua retenida por cantidad de proteína (Badui, 1999).

Si la concentración de las sales es superior a 1M se presenta el efecto contrario, ya que los polipéptidos precipitan debido a la insolubilización por salado (salting-out). En estas condiciones los iones tienden a hidratarse fuertemente y le quitan el agua que rodea a la proteína, obligándola a interactuar más estrechamente con otras de su clase (Badui, 1999).

Las sales que incrementan la solubilidad de las proteínas tienden también a desnaturalizarlas; estas sales pueden estar ligadas a las proteínas o reaccionar ligeramente con ellas. Las sales que estabilizan las proteínas disminuyen su solubilidad y tienden a ser excluidas de la superficie de las proteínas nativas. El NaCl a concentraciones de 0.3 a 1M induce un efecto salting-in en las proteínas miofibrilares, haciéndolas más inestables (Hultin et al., 1995).

La temperatura juega un papel importante en la solubilidad de las proteínas causando una disminución en este parámetro durante el calentamiento debido a que sufren desnaturalización y agregación. En general la solubilidad de las proteínas se ve incrementada a temperaturas de entre 0 y 40-50 °C. Sin embargo, al elevar la temperatura, se da un incremento de la energía cinética afectando las interacciones no covalentes que mantienen estables tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interactúan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Borderías y Montero, 1988; Badui et al., 1999).

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Una de las propiedades funcionales más utilizadas en la tecnología de alimentos, es la CRA, esta indica la cantidad de agua retenida por proteína después de filtrar y aplicar presión o fuerza centrífuga (Borderías y Montero, 1988).

En el músculo, el agua se puede encontrar de tres maneras, como agua unida la cual se encuentra en la vecindad de compuestos no acuosos como las proteínas y que posee muy poca movilidad; el agua atrapada que se encuentra atrapada ya sea en intersticios de las proteínas (pero no está unida a ellas) y/o por atracción del agua unida; y por último tenemos al agua libre que su flujo por el tejido muscular no se ve impedido (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005).

La capacidad de ligar agua varía dependiendo del tipo de proteína y su concentración, presencia de carbohidratos, lípidos, pH y sales. También puede estar influida por las condiciones del proceso previo, como el calor, el tratamiento con álcali, etc. Normalmente esta propiedad funcional se incrementa con la concentración de proteína (Flores y Bermell, 1984).

Gelificación Térmica

Un gel es una fase intermedia entre sólido y un líquido, técnicamente se define como un sistema substancialmente diluido el cual no muestra flujo en estado estacionario (Badui, 2006).

El mecanismo de gelificación involucra la formación de enlaces entre moléculas vecinas vía puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes. Estas uniones, producen la formación de redes tridimensionales durante el proceso de gelificación, ayudan a retener agua en el interior de la matriz y le dan rigidez al gel formado (Lanier et al., 2000).

La paramiosina del músculo de calamar, posee ciertas características que ayudan a formar geles proteicos más elásticos y cohesivos con respecto a las proteínas del pescado (Ponce et al., 2009).

Emulsificación

Está relacionada con la capacidad que tienen las proteínas para disminuir las tensiones entre la fase hidrofílica e hidrofóbica de un alimento. Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos no miscibles, uno de los cuales se encuentra bajo la forma de pequeñas gotas dispersas y el otro es la fase continua dispersante. La mayoría de las soluciones alimentarias son soluciones acuosas en aceite o de aceite en soluciones acuosas. El papel de las proteínas en estas emulsiones es el de formar una película entre la fase acuosa (polar) y grasa (apolar). La capacidad de que exista interconexión entre estas dos fases será determinante en la formación de la emulsión. Así, la proteína se desdobra y tiende a establecer un nuevo equilibrio termodinámico orientando sus grupos apolares a la fase de grasa y los polares a la fase acuosa, poniendo en relación a ambos (Bordarías y Montero, 1988).

Se ha reportado diferentes tipos de proteínas y su capacidad emulsificante (CE), en la Tabla 1, se puede observar que las proteínas de calamar tiene una alta CE, incluso por encima de lo reportado para aislado de soya, carne de pollo, vacuno; esta funcionalidad pudiera utilizarse para sustitución parcial o total de ellos en productos de untar o en el desarrollo de nuevos productos con mayor valor agregado (Abugoch et al., 2000).

Tabla 1. Capacidad emulsionante de proteínas alimentarias

Tipo de proteína	g aceite/ g proteína
Manto de calamar	2,817.41
Carne de jaiba	2,292.18
Aislado de soya	755
Pulpa de pollo	1,102
Carne de vacuno	1,061

(Abugoch et al., 2000)

Productos Comerciales de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

Los productos a partir de manto de calamar gigante surgen con ciertas reservas debido a que después de su captura presentan una supuesta actividad proteolítica alta, que se ve reflejada en la baja calidad físico-química y funcional del producto final (Pérez-Mateos et al., 2002).

Desde hace algunos años en nuestro país las industrias que se dedican al procesamiento del calamar gigante se han basado solamente en las siguientes presentaciones:

- Producto fresco (21,062 ton.)
- Productos congelados (18,825 ton.)
- Productos de calamar seco-salado (130 ton.)
- Producción de otros consumibles (1,266 ton.)

Según los datos reportados en el anuario del 2009 la presentación en fresco y congelado contribuyen en un 51% y 45.56% respectivamente (CONAPESCA, 2010). En todos los casos se identifican productos no terminados, exportando entonces, gran cantidad de estos productos como materias primas intermedias para otras industrias, por lo que son clasificados como productos de un valor agregado medio.

Elaboración de Nuevos Productos Emulsificados a Partir de Calamar

De manera general y en cuanto a alimentos se refiere, la actual tendencia va dirigida hacia el procesamiento de productos con valor agregado “listos para cocinarse” o “listos para consumirse” a nivel doméstico, existiendo un menor consumo de alimentos en restaurantes (FAO, 2009).

Durante las últimas décadas se ha tratado de comercializar el calamar gigante bajo diferentes contextos entre los que destacan: la elaboración de análogos de calamar tipo surimi (Borderías et al., 1990). De La Fuente et al.

(2008), proponen otra forma de obtención de este tipo de análogos a partir del músculo de calamar. Además de análogo, se han realizado investigaciones para proponer al calamar gigante como un concentrado proteico con propiedades funcionales para las industrias tecnológicas (Tejada et al., 2005).

Como hemos observado son pocas las formas de comercialización de esta especie. Los resultados de Félix-Armenta et al. (2009), muestran que realizar productos gel-emulsificados serían una alternativa viable para ampliar el campo de comercialización del calamar y proporcionarle un valor agregado. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que se requiere de una optimización de su formulación, así como de un aumento en su vida de anaquel, ya que la que el producto elaborado por estos autores no fue la adecuada, siendo los parámetros microbiológicos quienes dictaron el punto de corte para la misma

La optimización de este producto se debe realizar combinando diferentes niveles de los ingredientes que contribuyan a mejorar la textura del mismo. Tanto el almidón como los aislados de soya han sido muy utilizados en productos tipo surimi y salchichas bajas en grasa con el fin de reducir costos y mejorar la textura. Las principales funciones de estos ingredientes en la emulsificación, es la estabilización de la emulsión y de la gelificación, reducción de grasa, retención de agua entre otros (Verrez-Bagnis et al., 1993; Yang et al. 1995; Singh et al., 2008).

El uso de aislado de proteína de soya se maneja generalmente en rangos de 1% a 4%. Muchas formulaciones de productos cárnicos emulsificados que contienen tanto almidón como aislado de soya tienen un atractivo visual excelente, una buena textura, estos componentes no le confieren sabores extraños al producto, permite ahorrar dinero sustancialmente a quien elabora el producto y al mismo tiempo mantener la calidad nutricional (Beggs et al., 1997; Dexter et al. 1993; Singh et al., 2008).

Uso de Antimicrobianos Naturales para Extender la Vida de Anaquel de Productos Emulsificados

Uno de los principales problemas de la industria alimentaria a través de los años, ha sido la conservación de los alimentos (Barros et al., 2010). Muchas de las propiedades organolépticas y sensoriales de los alimentos tienden a disminuir con el tiempo, durante su almacenamiento y comercialización. Esto se puede atribuir a un gran número de factores como la acción del oxígeno, la luz y la temperatura, aunque mayormente a los efectos de microorganismos como hongos, bacterias o levaduras (Viuda-Martos et al., 2008). El crecimiento de los microorganismos se puede disminuir o inhibir mediante varios mecanismos, tales como la refrigeración, congelación, reducción de actividad de agua, restricción en el suministro de nutrientes, acidificación, fermentación o la adición de agentes antimicrobianos. Este último método ha sido descrito como especialmente eficaz en la lucha contra la proliferación microbiana (Kabuki et al., 2000; Viuda-Martos et al., 2008).

Hoy en día, los consumidores exigen cada vez más alimentos no perjudiciales para su calidad de vida, por lo que la industria alimentaria se ve en la necesidad de reducir el uso de componentes artificiales y aumentar la utilización de componentes naturales en la prevención del crecimiento microbiano (Deba et al., 2007; Viuda-Martos et al., 2008). Se han encontrado varios estudios como los de De Barros et al. (2010); Sureshkuma et al. (2010) Fernández-López (2007); entre otros, que consideran viable la utilización de este tipo de antimicrobianos para la extensión de la vida de anaquel.

Nisina

Las bacteriocinas producidas por las BAL son péptidos antimicrobianos generalmente estables al calor, hipoalergénico y aparentemente son degradadas fácilmente en tracto intestinal humano por las enzimas proteolíticas, (Chen y Hoover, 2003; Aymerich et al., 2008). La nisina es la única bacteriocina

aplicada a nivel comercial, fue aislada en 1928, ha sido utilizada como antimicrobiano en algunos alimentos desde la década del '50 y actualmente alrededor de 50 países han comprobado su efectividad logrando a la fecha ser reconocida como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration, USA) (Delves y Broughton 1990; Chen y Hoover, 2003). La adición de nisina en los alimentos representa una excelente estrategia para el control de bacterias patógenas las cuales son perjudiciales para la salud humana como son: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*, entre otras (De la Fuente-Salcido y Barboza-Corona, 2010).

El modo de acción de la nisina se basa en formar un complejo con el lípido II, una molécula precursora en la formación de las paredes celulares bacterianas. El complejo lípido II-nisina se inserta en la membrana citoplasmática formando poros y permitiendo un flujo de salida de componentes celulares esenciales, es decir, la disipación de la fuerza protón-motriz (PMF) por sus siglas en inglés, que en consecuencia provocan la inhibición o la muerte de las bacterias (Ennahar et al., 2000; Delves-Broughton, 2005). Este gradiente electroquímico (PMF) es necesario en diversos procesos metabólicos celulares, están compuestos de un potencial de membrana y un gradiente de pH y se vuelven dependientes de energía. Por tanto, al eliminar esta fuente de energía celular se promueve la salida rápida de metabolitos de menor tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula y eliminando por ende la proliferación bacteriana (Brotz et al., 1998).

La nisina presenta actividad antimicrobiana contra un amplio rango de bacterias Gram positivas, pero muestra poca o ninguna actividad contra las bacterias Gram negativas. Esta actividad disminuida contra Gram negativas, se le atribuye a que las paredes celulares que poseen este grupo de bacterias son mucho menos permeables que las paredes celulares de las bacterias Gram positivas. Sin embargo, se ha observado que cuando la nisina muestra efecto sobre bacterias Gram negativas es por la combinación con tecnologías de

obstáculos en el alimento (aplicación simultánea de barreras) (Delves-Broughton et al., 1996; Delves-Broughton, 2005; Aymerich et al., 2008).

Este espectro antimicrobiano ha dado como resultado que sea utilizada como conservante comercial en productos que por su naturaleza no pueden ser completamente esterilizados y sólo se pasteurizan durante su producción. La nisina se ve afectada por la temperatura y el pH, se ha observado que la utilización de altas temperaturas en combinación con pH de 5-7 la vuelven menos estable y se ha reportado que a temperatura de pasteurización la nisina puede mantener al menos el 80% de su actividad (Delves-Broughton et al., 1996). En productos mínimamente tratados térmicamente, curados, productos cárnicos envasados al vacío y refrigerados se recomienda aplicar la nisina para inhibir el deterioro por bacterias ácido lácticas presentes en el almacenamiento a baja temperatura (Delves-Broughton et al., 1996; Delves-Broughton, 2005).

La empresa Danisco en el 2005, reportó los distintos niveles de aplicación de nisina y Nisaplin® a nivel comercial, las concentraciones que se muestran en la Tabla 2, han sido consideradas las más comunes en el mercado de la conservación de alimentos. El producto (Nisaplin®), contiene 2.5% de ingrediente activo nisina, 77.5% de NaCl (sal) y leche en polvo sin grasa que contiene 12% de proteína y 6% de carbohidratos.

Es conocido que la concentración a utilizar de nisina es determinante para proporcionar el efecto antimicrobiano. Delves-Broughton, 2005, reporta que en salchichas cocidas de carne se han utilizado concentraciones de nisina de 1.25-6.25 mg/kg cuando se adicionan directo a la mezcla y en soluciones de inmersión de salchicha cocida varia de 5.0-25.0 mg/L se ha incrementado la vida útil almacenándolas 6-12°C.

Existen diversos estudios que han demostrado actividad antimicrobiana significativa de la nisina, dentro del área de productos pesqueros se muestran siguientes:

Tabla 2. Niveles de aplicación de nisina y Nisaplin® en alimentos

Food application	Typical target organisms	Level of nisin (mg/kg or mg/L)	Level of Nisaplin® (mg/L)
Processed cheese	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	5–15	200–600
Pasteurised milk and milk products	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	0.25–10.0	10–400
Pasteurised chilled soups	<i>B. cereus</i> <i>C. pasteurianum</i>	2.5–6.25	100–200
Crumpets	<i>B. cereus</i>	4–6.25	150–250
Canned foods (high acid)	<i>C. botulinum</i> and <i>thermosaccharolyticum</i>	2.5–5.0	100–200
Ricotta cheese	<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5–5.0	100–200
Continental type cooked sausage	Lactic acid bacteria, <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>L. monocytogenes</i>	5–25	200–1000
Dipping sauces	Lactic acid bacteria	1.25–6.25	50–250
Salad dressings	Lactic acid bacteria	1.25–5	50–200
Beer: pitching yeast wash	Lactic acid bacteria, eg. <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	25.0–37.5	1000–1500
post fermentation		0.25–1.25	10–50

(Delves-Broughton, 2005)

- En salmón ahumado se ha logrado combatir a uno de los patógenos más importantes (*L. monocytogenes*) en la industria de productos pesqueros. Aplicando cantidades de 500 UI/g hasta 1 000 UI/g, logra retrasar el crecimiento de dicho patógeno (Nilsson et al., 2004).
- En sardina contaminada ha sido efectivo la utilización de nisina combinada con el sistema lactoperoxidasa (Elotmani y Assobhei, 2004).
- Torry Reseach Station en el Reino Unido, combatieron el peligro potencial de botulismo en bacalao, arenque y mackarel envasados al vacío y empacados con atmósfera modificada, resultando un retraso significativo en la producción de esta toxina por la aplicación de nisina (Delves-Broughton, 2005).
- En productos emulsificados, Raju et al., (2003) aplicaron nisina en diferentes concentraciones a salchichas de pescado almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración, y encontraron que a razón de 50 ppm mejoró la fuerza de gel del producto e incrementó su vida de anaquel hasta 150 días, con respecto al control.

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de sustancias de naturaleza lipofílica procedentes de la destilación o prensado de plantas o partes de ellas. Los aceites esenciales provenientes de cítricos contienen de 85-99% de componentes volátiles y 1-15% de componentes no volátiles. Los compuestos volátiles son una mezcla de monoterpenos (limoneno), hidrocarburos de sesquiterpeno y sus derivados oxigenados que incluye: aldehídos (citrinal), cetonas, ácidos, alcoholes (linalol) y ésteres (Fisher y Phillips, 2008).

El mecanismo que otorga el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales no es del todo conocido, sin embargo existen mecanismos propuestos donde se ha observado que la membrana externa de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* se desintegra después de la exposición a carvacol y timol (Helander et al., 1998), además recientemente se ha reportado

en lo que respecta a *Listeria monocytogenes* que existe un engrosamiento importante y alteración de la pared celular, junto con una rugosidad aumentada y falta de citoplasma con la aplicación de aceite esencial de tomillo (Rasooli et al., 2006). También se ha observado estas características en *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes* pero en presencia de orégano y canela, respectivamente (Fisher y Phillips, 2008).

O'Bryan et al. (2008); Fisher y Phillips (2006); señalan que las bacterias Gram positivas y Gram negativas son sensibles a los aceites esenciales de cítricos y sus componentes, ellos concluyen que las bacterias Gram positivas fueron más sensibles que los Gram negativas posiblemente debido a que la membrana externa es relativamente impermeable. Sin embargo existen estudios que sugieren que hay un tiempo de retraso en el crecimiento de las bacterias Gram negativas, por tanto, durante un período de tiempo más largo puede tener el mismo efecto tanto en bacterias Gram negativas como en bacterias Gram positivas (Tassou et al., 2000). Esta sensibilidad diferencial se ha observado cuando se utilizan aceites de cítricos en estudios *in vitro*, pero no cuando se aplican directamente en alimentos (Fisher y Phillips, 2006). Esto último, ha ocasionado un gran interés de investigación y de búsqueda de posibles aplicaciones de los aceites esenciales en la industria de alimentos

Son relativamente pocos los estudios sobre la actividad antimicrobiana de aceites esenciales en sistemas modelo de alimentos ó en alimentos propiamente dichos. En el estudio de Aman et al., 2010, si bien no se trata de producto pesquero, se puede resaltar que el aceite esencial cítrico de limón fue más efectivo respecto al tomillo y al ajo. Logrando prolongar 6 días la vida de anaquel de carne picada de res.

Existen investigaciones en el área de productos pesqueros que han utilizado este tipo de antimicrobianos:

- Mahmud et al., 2004 encontraron que la microflora de piel, branquias e intestinos de carpa, se reduce con Citral y Linalool. En este estudio se

resalta que el Linalool mostró efecto solo contra las bacterias aisladas de la piel en concentraciones de 2% v/v, mientras que el Citral a 1% y 2% fue eficaz no solo contra bacterias aisladas de la piel, sino también mostró efecto en branquias e intestinos de la carpa.

- Kim et al., (1995) aplicaron Citral a concentraciones de 0.5-3% p/v en cubos de pescado, observando reducción de las bacterias Gram negativas y una disminución en la población final de hasta 1,5 log UFC/g.

Se torna interesante probar este tipo de antimicrobianos en productos emulsificados a partir de músculo de calamar gigante y evaluar el impacto que tienen en la prolongación de su vida de anaquel, ya que las principales bacterias presentes en este tipo de productos son las Gram positiva (Félix-Armenta et al, 2009). Según los estudios mostrados anteriormente, tanto la nisina como los aceites cítricos actúan sobre éste tipo de bacterias, y sería interesante comparar dichos antimicrobianos sobre este tipo productos.

HIPÓTESIS

La incorporación de un antimicrobiano natural mantiene las características de calidad durante la vida de anaquel de un producto gel-emulsificado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) optimizado con soya y almidón.

OBJETIVOS

Optimizar la formulación de un producto gel-emulsificado de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y evaluar el efecto de dos antimicrobianos naturales sobre sus parámetros de calidad y vida de anaquel durante el almacenamiento en refrigeración.

Objetivos específicos:

- Establecer las concentraciones óptimas de proteína de soya y almidón en la formulación de un producto tipo salchicha.
- Evaluar en la fórmula optimizada el efecto de la adición de dos antimicrobianos naturales (Nisaplin® y Citrol-K Ultra®) durante el almacenamiento en refrigeración.
- Evaluar el efecto del mejor antimicrobiano natural sobre las características físico-químicas, sensoriales y microbiológicas del producto optimizado durante su vida de anaquel en refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo se plantearon 3 etapas experimentales:

Etapa I: Consistió en la optimización de la fórmula

Etapa II: Consistió en la elección del antimicrobiano natural más efectivo

Etapa III: Se evaluó la vida de anaquel de la salchicha optimizada y con el antimicrobiano que resultó ser más efectivo en la etapa previamente descrita.

Etapa I: Optimización de la Formulación de Salchicha de Calamar

Formulación

Para el desarrollo de la formulación del producto, se tomó como referencia un producto gel-emulsificado de calamar elaborado previamente por el Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros de CIAD (Félix-Armenta et al., 2009), cuyos ingredientes se muestran en la Tabla 3. De esta fórmula se establecieron 2 ingredientes para ser optimizados, almidón y soya, por ser mejoradores de textura (retienen agua, proporcionan estabilización a la emulsión y a la gelificación, entre otros). Se emplearon 5 niveles de cada uno: Para el almidón los niveles oscilaron en un rango de 3-6% y para la soya entre 0-3.5% de acuerdo con la NOM-122-SSA1-1994. Utilizando la metodología de superficie de respuesta se obtuvieron un total de 12 formulaciones diferentes, cada formulación fue procesada en cantidad de 3 kg; solo almidón y soya fueron modificados en cada fórmula el resto de los ingredientes se adicionaron como se indica en la Tabla 3 y se ajustaron al 100% con agua.

Tabla 3. Ingredientes y proporciones utilizadas de formulación de salchicha de calamar.

Ingrediente	Porcentaje
Músculo	68.07
Hielo	19.48
Almidón modificado de papa *	--
Aislado de soya*	--
Aceite (Canola)	2.09
Sales	1.31
Fosfatos	0.52
Eritorbato (isoascorbato)	0.16
Condimentos	1.75
Color (rojo-fresa)	0.02

*Ingredientes modificados

Elaboración del producto

El desarrollo del producto se muestra en el diagrama de proceso de elaboración (Figura 1), y se detalla a continuación:

- 1) Pesado de los ingredientes: Se pesó e identificó a cada uno de los ingredientes por separado según la Tabla 3.
- 2) Preparación del músculo: Un solo lote del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) fue adquirido en forma congelada en una distribuidora local, ubicada en Hermosillo, Sonora. El calamar, inmediatamente se trasladó en hielera a las instalaciones del CIAD, para su posterior procesamiento, 24 horas antes de su procesamiento fue atemperado a 4 °C para su limpieza, la cual consistió en la eliminación de piel interna y externa para proceder a ser cortado en trozos de 3 cm. El músculo se refrigeró, hasta alcanzar la temperatura de 4°C, para su posterior procesamiento.
- 3) Preparación de la emulsión. Una vez que la temperatura del músculo fue la adecuada (4°C), se incorporó el músculo a una cutter Kilia Vacu Autoc 30 (Kilia Co., Kiel, Alemania), para agregarle posteriormente los ingredientes (Tabla 3) de la siguiente manera: 2/3 de hielo, sal fina, sal cura, azúcar, condimento, fosfatos, humo líquido, colorante, aceite de canola, aislado de soya, almidón de papa, 1/3 de hielo y por último el eritorbato. El proceso se realizó a una velocidad de 792 rpm, una vez mezclado los ingredientes se le aplicó vacío para una mejor incorporación de los mismos. La temperatura de la pasta fue mantenida menor a 10 °C.
- 4) Embutido. La pasta obtenida en el paso anterior se embutió en fundas de celulosa calibre 23 mm, en una embudidora de pistón Smith Modelo RS-2050 (Smith Equipment Co. Clifton, NJ), el producto se amarró manualmente con hilo de algodón ajustando su tamaño de 10 a 12 cm.
- 5) Tratamiento térmico. El tratamiento térmico se llevó a cabo en un horno Enviro Pak Micro-Pak Series Mp1000 (Enviro Pak, Clackamas, OR), bajo



Figura 1. Proceso general de elaboración de salchicha de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

las condiciones que se detallan en la Tabla 4, todas las formulaciones fueron horneadas al mismo tiempo.

- 6) Enfriamiento: Una vez terminado el tratamiento térmico, el producto se sumergió en un baño de agua-hielo (30/70 v/p) por 5-10 min, con la finalidad de dar un shock térmico para favorecer la disminución de la temperatura interna del producto y detener el proceso de pasteurización que se inició en el horno.
- 7) Almacenamiento: Una vez enfriado el producto se almacenaron en refrigeración a una temperatura <4 °C para su posterior análisis.

En el anexo 1 se ilustra la elaboración de salchicha de calamar y en el anexo 2 sus análisis correspondientes.

Análisis de Producto Terminado

Análisis proximal. El contenido de humedad se determinó a temperatura constante a 105°C utilizando una estufa de convección de aire (método 950.46), el contenido de cenizas se determinó a 550°C (método 938.02) y la grasa (método 920.39) se determinó por Goldfish, todos de acuerdo al procedimiento de la AOAC (2000). Para la determinación de proteína se llevó a cabo por Microkjeldahl y se siguió la metodología establecida por Woyewoda et al. (1986). Estas determinaciones se hicieron por triplicado para cada fórmula.

Análisis Físicoquímicos. Los análisis físicoquímicos que se realizaron al producto de calamar comprendieron: pH, capacidad de retención de agua (CRA), actividad de agua (a_w), color (interno y externo) y textura, los cuales se describen a continuación:

pH. La determinación del pH se realizó por la técnica de inmersión en una solución 1:2 (salchicha:agua destilada), la muestra fue previamente homogenizada en un procesador de alimentos Black & Decker (Short cut), de acuerdo con la técnica descrita por Woyewoda et al. (1986). Se utilizó un potenciómetro 240 Corning (Acton, MA, USA).

Tabla 4. Especificaciones de tiempo y temperatura del proceso de cocción de salchicha de calamar.

ETAPA	TIEMPO	TEMPERATURA (°F)		
		BS	BH	INTERNA DEL PRODUCTO
Calentamiento	20	135	110	-
Precocido	20	165	150	-
Cocido	20	185	185	-
Pasteurización	10	160	160	162
Enfriamiento en horno	5	-	-	-

*BS: bulbo seco y BH: Bulbo húmedo.

Actividad de Agua (a_w). Para esta determinación la muestra fue homogenizada y colocada en los recipientes especiales que contiene el equipo. Esta determinación se realizó por lectura directa con un higrómetro AquaLab CX-2 (Decagon Devices Inc, Pullman, WA).

Capacidad de retención de agua (CRA). La CRA se determinó por centrifugación utilizando la metodología de Cheng et al. (1979). Se utilizaron 5g de salchicha, se centrifugaron a 28,500 x g durante 30min a 4°C en una centrifuga Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments, Inc. Palo Alto CA).

Evaluación de color interno y externo. Este parámetro se evaluó mediante el sistema de colorimetría de triestímulo utilizando un colorímetro portátil Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Japón). Se obtuvieron los valores de “L” (luminosidad), “a” (matiz rojo-verde) y “b” (matiz amarillo-azul), tanto para color interno como para el color externo y se calculó el ángulo de matiz (1) (Mc.Lelland et al., 1995). Para obtener los valores de color interno se cortaron rodajas de 1 cm y para el color externo se realizó un corte transversal de 3 cm.

$$\theta = b^*/a^* \quad (1)$$

Textura. La textura fue evaluada a través de 3 parámetros: análisis de perfil de textura, esfuerzo al corte y prueba de doblado

- a) Análisis de perfil de textura (APT). Para la realización del análisis las salchichas se cortaron en porciones cilíndricas con medidas de 1 cm x 1 cm, dejándose reposar por 1 h a temperatura ambiente dentro de una bolsa de polietileno para evitar la pérdida de humedad, la medición se realizó de acuerdo al método de Bourne (2002), con ciertas modificaciones. Se realizó una doble compresión a un 75% y a una velocidad de 1 mm/s, con un tiempo de espera de 5 seg entre cada compresión, utilizando una celda de 500N, éste estudio se efectuó en un texturómetro TMS-Pro (Food Technology Corporation, Sterling, VA). Las variables evaluadas fueron dureza, cohesividad y elasticidad.

- b) Esfuerzo al corte. El esfuerzo al corte se determinó por medio del texturómetro TMS-Pro (Food Technology Corporation, Sterling, VA) con una navaja Warner – Bratzler como aditamento, de acuerdo al método de Bourne, (2002), bajo las siguientes condiciones: Se cortaron trozos de salchicha de 3 cm de largo y a su vez, estos se cortaron transversalmente por la mitad, dejándose reposar por una hora dentro de una bolsa de polietileno para evitar la pérdida de humedad en las mismas. Las condiciones a las cuales se realizó el estudio fueron utilizando una velocidad de cabezal de 2 mm/s y un desplazamiento de 30 mm. Los resultados se tomaron del pico máximo (fuerza máxima) resultante del esfuerzo al corte.
- c) Prueba de doblado. Se cortaron rodajas de 2-3 mm de espesor, se tomó entre los dedos índice y pulgar, para posteriormente seguir la metodología descrita por Kudo et al. (1973). Una vez realizado el procedimiento se calificó de acuerdo a la Tabla 5.

Análisis Sensorial. Los atributos sensoriales se midieron con una prueba descriptiva de acuerdo a lo establecido por Pedrero y Panborn (1989). El panel fue de un grupo de 8 personas entrenadas, trabajadores de CIAD, A.C. Se utilizó una escala de 0-10 para los atributos de color, apariencia general y sabor, donde el 0 = me disgusta mucho y el 10= me gusta mucho. Los panelistas también evaluaron textura al morder y textura al masticar, donde se utilizó una escala de 10 puntos, representando el 5 el valor ideal, los valores por encima de 5 se calificaron como textura blanda y los valores por debajo de 5 se calificaron como textura dura. Para la referencia del valor ideal de la textura se utilizó una salchicha comercial. En el anexo 3 (a) se muestra el formato utilizado en esta evaluación sensorial.

Diseño de experimentos

Se estudiaron el efecto de 2 factores composicionales, utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Las condiciones experimentales fueron

Tabla 5. Escala de puntos para la prueba de doblado.

Escala de puntos	Grado Nishiya	Observaciones
5	AA	No se rompe al doblarlo en cuadrantes
4	A	No se rompe al doblarlo por la mitad, se rompe al doblarlo en cuadrantes
3	B	Se quiebra al doblarlo por la mitad
2	C	Se rompe en partes al doblarlo por la mitad
1	D	Se fragmenta al tocarlo con los dedos

Kudo et al., (1973)

establecidas en base a un diseño Central Compuesto Rotatorio para 2 factores y dos niveles (2^2) con cuatro puntos centrales (Montgomery, 2003). Los factores del presente estudio son X_1 (Almidón) y X_2 (Soya), para los cuales se establecieron los niveles mínimos y máximos, codificándolos en 5 niveles (-1.414, +1.414, -1, +1 y 0) para realizar la optimización. El valor ± 1.414 representa los puntos axiales del diseño, ± 1 representa los puntos factoriales y 0 indica los puntos centrales. Los puntos axiales se incluyen en el modelo para que proporcione la curvatura al modelo, es decir, hacerlo rotatorio. Se utilizaron 4 puntos centrales para estimar la suma de cuadrados del error puro. El diseño se muestra en la Tabla 6 y consistió de 12 formulaciones. Los valores naturales no se muestran debido a la confidencialidad del estudio.

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se ajustó un modelo de regresión para cada variable de respuesta, el cual estima el análisis de varianza de la regresión por el método de cuadrados mínimos, de acuerdo a la MSR. El modelo consistió en una ecuación polinomial de segundo orden (2) como se muestra a continuación:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{12}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{12}X_1X_2 \quad (2)$$

Donde:

B_0 = Intercepto

B_1X_1 = Coeficiente de regresión lineal para X_1

B_2X_2 = Coeficiente de regresión lineal para X_2

$B_{12}X_1^2$ = Coeficiente de regresión para X_1 con efecto cuadrático

$B_{22}X_2^2$ = Coeficiente de regresión para X_2 con efecto cuadrático

$B_{12}X_1X_2$ = Coeficiente de regresión para productos cruzados X_1 y X_2

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se buscó la adecuación del modelo completo para determinar los efectos significativos en cada una de las variables evaluadas. Además el ajuste y selección del modelo se realizó de acuerdo a los términos de falta de ajuste y del análisis del coeficiente de determinación (R^2). Algunos de los modelos completos obtenidos inicialmente, no representaban de forma adecuada los datos, por lo que se procedió a la reducción de términos que menos contribuían en la respuesta, tomando como

Tabla 6. Corridos experimentales del diseño central compuesto rotatorio para dos factores (2^2).

Formulación	Factores	
	X_1	X_2
1	-1	1
2	1	-1
3	1	1
4	-1	-1
5	0	-1.414
6	0	1.414
7	-1.414	0
8	1.414	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

X_1 =Almidón, X_2 =Soya

criterio estadístico para la eliminación los de mayor probabilidad ($P > 0.05$). Con lo anterior se pudieron obtener los modelos de predicción, se establecieron las condiciones óptimas tanto de las variables como de los factores y se procedió a la realización de graficas de superficie de respuesta de tercera dimensión solo para las variables que se observó significancia de los factores. Se graficó y procesaron los datos en el paquete estadístico JMP de SAS versión 8.0.

Los resultados de validación fueron analizados a través de una prueba “T” comparando los valores óptimos predichos por el modelo con los obtenidos experimentalmente, todo ello en paquete estadístico NCSS 2010.

Etapa II: Elección de Antimicrobiano Natural

Una vez obtenida la fórmula óptima de la Etapa I, se procedió a evaluar el efecto de dos antimicrobianos naturales sobre esta formulación.

Tratamientos

Se realizaron un total de 5 tratamientos, 2 repeticiones por tratamiento preparando 3 kg de producto para c/u, se probaron 2 antimicrobianos naturales (Nisaplin® y Citrol-K Ultra®) a 2 diferentes concentraciones para c/u. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Control, sin antimicrobiano; 2) Nisaplin® a 200 ppm (5 ppm de nisina pura); 3) Nisaplin® a 320 ppm, (8 ppm de nisina pura); 4) Citrol-K Ultra® a 375 ppm; y 5) Citrol-K Ultra® a 500 ppm. Las concentraciones utilizadas de Nisaplin® se encuentran dentro de los límites establecidos por el CODEX (500 ppm de nisina comercial) y para el caso de Citrol-K Ultra® se utilizó de acuerdo a la recomendación del proveedor. Nisaplin® contiene 2.5% de nisina pura, por lo que las concentraciones utilizadas corresponden a 5 ppm y 8 ppm de nisina pura.

El producto fue elaborado siguiendo la metodología descrita en la Etapa I. Los tratamientos fueron almacenados durante 35 días a 4°C realizando los análisis a los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35.

Evaluaciones

Primeramente se realizó un análisis proximal al tiempo 0 de acuerdo a la metodología descrita en la Etapa I, con la finalidad de corroborar que el antimicrobiano era probado sobre un producto con las mismas características de composición proximal que el optimizado.

Los parámetros utilizados para la selección del antimicrobiano fueron:

- a) Microbiológicos: se utilizaron las técnicas descritas en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y el Bacteriological Analytical Manual (BAM) (1998). Los protocolos a seguir fueron los siguientes: Cuenta estándar en placa de bacterias aerobias mesófilos (PCA, $37 \pm 1^\circ\text{C}$) y psicrófilos (PCA, $4 \pm 2^\circ\text{C}$), (BAM, Capítulo 3 y NOM-092-SSA1-1994). Los microorganismos microaerófilos (bacterias ácido lácticas) fueron desarrollados en agar MRS ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) bajo CO_2 (4-10%). Las muestras fueron procesadas por duplicado para cada repetición.
- b) Físico-químicos: Se evaluó pH y a_w , bajo la misma metodología descrita en la primera etapa.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

El diseño experimental utilizado para esta etapa fue Bloques Completos al Azar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza por modelos lineales generales. El modelo incluyó al tiempo como bloque y a los tratamientos como efecto principal. Cuando se encontró efecto de los tratamientos, se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el programa estadístico NCSS (2010).

Etapa III: Evaluación de la Vida de Anaquel

Una vez obtenida la formulación óptima y elegido el antimicrobiano natural que tuvo mejor efecto, se procedió a evaluar la vida de anaquel del producto en refrigeración a 4 °C durante 42 días, las evaluaciones se realizaron cada 7 días, incluido el día cero.

Se realizaron dos tratamientos: 1) Control (fórmula sin antimicrobiano); 2) Fórmula con antimicrobiano. Ambas se realizaron por duplicado siguiendo la misma metodología descrita en la Etapa I.

Evaluaciones

Proximal. Fue realizado en el tiempo 0, de acuerdo a la metodología descrita en la Etapa I y solo la humedad fue evaluada durante el periodo de almacenamiento.

Fisico-químico. Se evaluó pH, CRA, a_w , color y textura (metodología de la Etapa I).

Análisis Microbiológico. Además de las bacterias evaluadas en la Etapa II, en esta Etapa se incluyeron *Coliformes totales y fecales*, siguiendo la metodología del Número Más Probable (NMP) utilizando caldo lactosa lauril sulfato a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y caldo bilis verde brillante a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, respectivamente (NOM-112-SSA1-1994 y BAM, Capítulo 4) como índice de higiene. Como organismos patógenos de interés para este tipo de producto, se evaluó *Escherichia coli* utilizando caldo EC a $42\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (NOM-112-SSA1-1994 y BAM, Capítulo 4), *Salmonella spp.* utilizando Xilosa Lisina Desoxicolato Agar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (NOM-114-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* utilizando Baird Parker Agar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (NOM-115-SSA1-1994) y para *Listeria monocytogenes* se utilizó el método de oxford Modificado a 37 °C (NOM-143-SSA1-1995 y BAM, Capítulo 10).

Análisis Sensorial. Se realizó la prueba de diferencias contra el control; para ello se utilizó una escala no estructurada de 7 cm, donde el 0 = nada (sin diferencia) y el 7 = extremadamente diferentes (Meilgaard et al., 1987). Para el análisis un grupo de 8 panelistas entrenados (personal del CIAD, A.C.) evaluaron los parámetros de olor, sabor, color, apariencia general, textura al morder y al masticar. Las diferencias se calcularon promediando los valores obtenidos para cada atributo/día. En el anexo 3 (b y c) se muestran los formatos utilizados.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los datos se ajustaron a un diseño en bloques completamente al azar. Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza por modelos lineales generales. El modelo incluyó al tiempo de almacenamiento como bloque y a los tratamientos como efecto principal. Cuando se encontró efecto de los tratamientos, se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el paquete estadístico NCSS (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I: Optimización de la Formulación de Salchicha de Calamar

Análisis Proximal

Se realizó el análisis proximal de las fórmulas obtenidas (Tabla 7), en el cual se modificaron las concentraciones de dos ingredientes (almidón y soya) de acuerdo al diseño central compuesto 2². El contenido de humedad varió del 73.53% al 78.05%, los valores se encuentran por encima (70%) de lo recomendado por la norma mexicana NMX-F-065-1984; sin embargo, el tratar de reducir la humedad al valor recomendado repercutiría en las características sensoriales del producto. El contenido de proteína en las formulaciones osciló de 8.7% al 10.42%, en general los valores están dentro de lo recomendado por la norma mexicana (9.5%) para productos tipo salchicha citada anteriormente. El nivel más bajo de proteína se observó en la fórmula 5, al cual le corresponde a un nivel bajo de soya. El contenido de grasa se encontró (1.22%-1.87%) muy por debajo de lo que sugieren como límites máximos permitidos (30%), por lo que este producto puede considerarse “bajo en grasa” de acuerdo con la NOM-086-SSA1-1994. Es importante resaltar que el calamar tiene un contenido muy bajo de grasa y la grasa presente en estas formulaciones es añadida en su gran mayoría como parte de los ingredientes, considerándose un punto nutricional favorable que puede hacerlo atractivo para el consumidor. El contenido de ceniza varió de 2.05%-2.94%. Las variaciones de la composición proximal de las 12 formulaciones, se encontraron dentro de los límites establecidos por las normas.

Tabla 7. Composición proximal de las diferentes formulaciones de salchicha de calamar gigante.

Formulaciones	Variables independientes		Humedad (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Ceniza (%)
	X ₁	X ₂				
1	-1	1	75.99	1.28	9.83	2.49
2	1	-1	75.32	1.39	9.07	2.55
3	1	1	73.53	1.59	9.86	2.94
4	-1	-1	76.90	1.31	9.03	2.45
5	0	-1.414	77.55	1.28	8.71	2.21
6	0	1.414	74.30	1.57	10.42	2.42
7	-1.414	0	77.00	1.71	9.84	2.29
8	1.414	0	75.51	1.80	9.38	2.28
9	0	0	75.50	1.85	9.87	2.35
10	0	0	76.39	1.87	9.77	2.19
11	0	0	78.05	1.84	9.56	2.05
12	0	0	75.86	1.31	9.67	2.38

X₁=Almidón; X₂=Soya

Análisis Físico-químicos

A continuación se muestran los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones fisicoquímicas de las formulaciones elaboradas (Tabla 8).

pH. Los valores de pH variaron de 6.24 a 6.72; dicha variación se encuentra dentro del rango de productos embutidos (6.21-6.67) (Koniecko, 1979). El pH más bajo se encontró en la fórmula 11, correspondiente a los puntos centrales; sin embargo; los otros 3 puntos centrales mostraron un pH promedio de 6.5, dicha variación puede atribuirse como parte del error puro del modelo.

Actividad de agua (a_w). Los valores de actividad de agua presentaron pequeñas variaciones entre 0.93 y 0.96. La a_w más baja se presentó en los niveles medios de almidón.

Capacidad de retención de agua (CRA). Los valores variaron de 84.25% a 97.95% (Tabla 8), mostrando la mayoría de las formulaciones un valor por encima (85.56%) de lo reportado para salchicha de calamar (Felix-Armenta et al., 2009), concordando estos valores con lo reportado (96-98%) para salchicha de trucha a partir de filetes fresco y congelado (Dincer y Cakli 2010). La CRA más baja se presentó en la formulación 5, la cual contiene el nivel más bajo de soya poseyendo un nivel medio de almidón. Por otro lado, la fórmula 7, presentó la CRA más alta, esta contiene niveles altos de almidón y soya; además, presentó el contenido de humedad más bajo. Estudios en salchichas de pescado muestran que hay una relación directamente proporcional de la CRA al aumentar ó disminuir tanto el contenido de almidón como de proteína (Mohammadi y Oghabi, 2011; Huda et al., 2012).

Dureza. Los rangos de textura correspondiente a las 12 formulaciones fueron desde 0.98 kg_F/g a 2.85 kg_F/g. La fórmula 5, fue la presentó la dureza más baja, lo cual se refleja con lo observado en los parámetros de humedad y CRA coincidiendo con lo reportado por diversos autores (Chang y Carpenter 1997; Yang et al., 2006; Huda et al., 2012) concluyendo que niveles más altos de

Tabla 8. Características fisicoquímicas de las formulaciones de salchicha de calamar gigante.

Formulaciones	Variables independientes		a_w	pH	CRA (%)	Elasticidad (%)	Cohesividad (%)	Dureza (kg _F /g)	EC (kg _F /g)	PD
	X_1	X_2								
1	-1	1	0.96	6.72	89.04	77.42	42.72	1.35	0.13	4.75
2	1	-1	0.96	6.56	91.38	83.03	37.67	1.74	0.12	4.75
3	1	1	0.95	6.55	97.45	88.30	52.55	2.85	0.19	5.00
4	-1	-1	0.94	6.65	88.66	89.00	34.18	1.25	0.10	5.00
5	0	-1.414	0.93	6.67	84.25	85.70	39.94	0.98	0.08	4.75
6	0	1.414	0.96	6.49	91.62	85.70	46.43	2.69	0.20	4.25
7	-1.414	0	0.96	6.28	85.22	80.00	42.71	1.30	0.09	5.00
8	1.414	0	0.95	6.29	93.27	86.65	36.41	1.75	0.10	5.00
9	0	0	0.95	6.53	95.51	81.24	36.29	1.85	0.12	4.25
10	0	0	0.95	6.50	92.72	78.50	32.55	1.48	0.08	4.75
11	0	0	0.95	6.24	93.78	87.74	48.43	1.92	0.12	4.50
12	0	0	0.94	6.41	95.84	86.35	49.82	1.93	0.15	4.25

X_1 =Almidón; X_2 = Soya

humedad disminuyen la dureza del producto. Además, los resultados reflejan al igual que el estudio de Rahman et al. (2007), refleja que la dureza de un producto se ve afectada la adición de almidón.

Cohesividad. Estos parámetros oscilaron entre 32.55%-52.55%, siendo la formulación 3 la que presentó mayor cohesividad conteniendo un nivel alto de almidón y soya. La salchicha de calamar de Félix-Armenta et al. (2009) mostró valores similares de cohesividad (36%) a los obtenidos en el presente estudio. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Beggs et al. (1997) encontrándose que los altos niveles de almidón imparten mayor cohesión en salchichas de pavo.

Elasticidad. La formulación menos elástica fue la número 1 (77.42%), la cual contiene un nivel bajo de almidón y un nivel alto de soya; sin embargo, estos valores muestran que es más elásticas que lo reportado por Cardoso et al. (2008), para salchicha de merluza (59.8%). Por otro lado, la fórmula 4, fue la más elástica (89%), al cual contiene niveles bajos tanto de almidón como de soya. El anterior resultado de elasticidad corresponde con lo reportado para salchicha de corvina (Ribeiro et al., 2012).

Esfuerzo al corte (EC). La fuerza de corte de la salchicha de calamar parece estar directamente relacionada con la dureza, ya que el menor EC se presentó en la fórmula 5, misma que presentó la menor dureza (0.08); este mismo comportamiento fue observado para las formulaciones con el mayor EC. Estos valores concuerdan con lo reportado en el estudio de salchichas comerciales de pescado (Huda et al., 2012).

Prueba de doblado (PD). Esta parámetro en las salchichas de calamar parece estar relacionado con la elasticidad, las formulaciones con mayor elasticidad (fórmulas 3 y 4) son las que se calificaron con una escala numérica de 5, que representa un gel grado AA (Tabla 8), es decir, no se rompe al doblarlo en cuadrantes, según la clasificación de Nishiya, mostrada por Kudo et al. (1973). En general, las 12 formulaciones pudieron formar geles resistentes al doblado

ya que los valores se mantuvieron dentro del rango de 4.25-5 siendo superiores a lo reportado para salchicha de merluza (Cardoso et al., 2008), concordando con los valores reportados en el estudio realizado para salchichas de pescado comercial (Huda et al., 2012).

Color. Se muestran los promedios de las evaluaciones realizadas de color interno y externo de las 12 formulaciones. Los valores de L^* (luminosidad) tanto para el color interno como externo variaron de 78.37-82.81 y 76.44-82.51, respectivamente. El parámetro L^* en color interno y externo indicó que la fórmula 8 presentó la menor luminosidad y la fórmula 5 la mayor luminosidad. El parámetro a^* (rojo-verde, +/-) para todas las formulaciones se posicionó en el cuadrante positivo en un rango de 1.77 a 6.30 para el color interno y de 3.45 a 10.16 para el color externo. Los valores de b^* (amarillo-azul, +/-) se posicionaron en tonalidades amarillentas (escala positiva) oscilando los valores de color interno de 8.02 a 15.62 y el color externo de 9.9 a 14.66. Los resultados muestran que tanto para el color interno como externo, los aumentos o disminuciones de los parámetros a^* y b^* están relacionadas con las variaciones en los niveles de soya, un comportamiento similar fue observado en salchichas de puerco y pescado (Thomas et al., 2008; Huda et al., 2012). Además, de manera general en las formulaciones se observó un ligero aumento en los parámetros de color externo no así para el color interno que parece estar relacionado con dichas variaciones en la concentración de soya.

Con la finalidad de observar los cambios de color de a^* y b^* en este producto, se integraron estos parámetros al ángulo de matiz. En la Tabla 9 se observa que para el color interno los valores oscilaron de 57.64 a 82.64 y para el color externo 78.45 a 85.01, hubo un aumento generalizado del color externo no así para el color interno. Con estos resultados el producto se ubica el cuadrante I (rojo-amarillo) de la esfera cromática de color.

Tabla 9. Parámetros de color interno y externo de las distintas formulaciones de salchicha de calamar gigante.

Formulaciones	Variables independientes		Color interno				Color externo			
	X ₁	X ₂	L*	a*	b*	Ángulo de matiz	L*	a*	b*	Ángulo de matiz
1	-1	1	82.13	1.77	11.17	80.98	81.10	3.65	13.94	82.16
2	1	-1	82.28	4.69	8.74	74.04	79.56	4.69	13.14	83.71
3	1	1	80.35	1.47	11.36	82.64	77.31	4.50	15.16	81.68
4	-1	-1	82.81	4.13	8.02	64.17	82.05	4.95	11.64	84.46
5	0	-1.414	83.13	4.57	7.21	57.64	82.51	3.45	9.93	85.01
6	0	1.414	80.64	1.59	11.38	82.05	77.00	4.23	14.66	81.59
7	-1.414	0	80.60	6.33	15.30	67.92	80.59	7.17	11.30	79.08
8	1.414	0	78.37	6.85	15.62	66.32	76.44	9.05	10.38	78.45
9	0	0	80.76	5.53	15.47	70.31	78.21	8.32	10.96	78.81
10	0	0	80.79	6.29	15.21	67.43	79.80	9.05	9.90	79.22
11	0	0	79.83	7.53	14.22	62.08	77.49	10.16	9.95	79.60
12	0	0	79.52	6.30	14.75	66.90	77.87	8.93	11.21	79.27

X₁= Almidón; X₂=Soya

Análisis Sensorial

Para el parámetro de color, sabor y apariencia se utilizó una escala de 10 puntos, donde 10 equivale a “me gusta mucho”, 5 “ni me gusta, ni me disgusta” y 0 “me disgusta mucho” (Pedrero, D.L. y Pamgbor, R.M., 1989). Los panelistas calificaron con mejor color a la formulación 10 (8.52), la cual fue la que presentó también los valores más altos de color en la medición instrumental. El sabor tuvo una puntuación máxima de 8.39 correspondiente a la fórmula 12 y la puntuación más baja (4.62) para la fórmula 1. Por último, en el atributo de apariencia nuevamente es ligeramente castigada la formulación 1 y las formulaciones mejor evaluadas son la 8 y 12. Como se puede observar, los tres parámetros mostraron sus mejores evaluaciones en las formulaciones que corresponden a los puntos centrales del diseño (Tabla 10). Para los atributos de textura al morder y masticar la escala es de 10 puntos y el valor ideal es representado por el 5, para el atributo de textura la morder la fórmula 3 fue calificada como una textura ligeramente dura (4.07), misma que mostró en el Análisis de Perfil de Textura (APT) mayor dureza y esfuerzo al corte. La fórmula 5 muestra una textura blanda (7.92), la cual se reflejó en el APT ser más blanda y con menor esfuerzo al corte, esta correspondencia del análisis instrumental y sensorial se ha encontrado en el estudio de Rahaman et al., (2007). Las formulas 1 y 12 fueron calificadas en la textura al morder como las más cercanas al ideal. Por otro lado, la textura al masticar tuvo el mismo comportamiento que la textura al morder siendo la fórmula 3 la que se observó la puntuación más baja (3.93) y la fórmula 5 (8.02) calificada con puntuación más alta. Cabe mencionar que hubo fórmulas que fueron evaluadas en la textura al masticar como muy cercanas al ideal (1, 6, 7, 8 y 12).

Las calificaciones obtenidas en los atributos sensoriales de las salchichas del presente estudio, son mayores a los reportadas por Félix-Armenta et al., (2009), quienes utilizaron la misma escala de evaluación para una salchicha de calamar. En términos generales los panelistas reflejaron su por todos los aspectos evaluados (color, olor, sabor, apariencia y textura) en las

Tabla 10. Calificaciones promedio de los atributos sensoriales de formulaciones de salchichas de calamar gigante.

Formulaciones	Variables independientes		Color	Sabor	Apariencia	Textura al morder	Textura al masticar
	X ₁	X ₂					
1	-1	1	3.43	4.62	4.82	5.14	5.36
2	1	-1	7.65	8.18	7.88	6.06	6.21
3	1	1	6.46	6.27	4.96	4.07	3.93
4	-1	-1	7.60	8.05	7.82	6.59	6.83
5	0	-1.414	6.55	7.26	6.33	7.92	8.02
6	0	1.414	7.00	7.77	6.46	5.23	5.34
7	-1.414	0	7.40	6.95	5.50	5.85	5.83
8	1.414	0	8.20	8.32	8.69	5.83	5.80
9	0	0	7.82	7.85	6.28	6.96	7.00
10	0	0	8.52	7.90	6.40	7.53	7.50
11	0	0	7.18	7.37	8.07	5.77	6.15
12	0	0	7.79	8.39	8.59	5.39	5.49

X₁= Almidón; X₂=Soya

Color, Sabor y Apariencia: 0= Me disgusta mucho;10= Me gusta mucho

Textura al morder y Textura al masticar: <5= Textura dura; 5= Ideal; >5= Textura blanda

las formulaciones posicionadas en los puntos centrales.

Elección de los Modelos Predictivos

Los modelos predictivos obtenidos por MSR, se muestran en los Tablas 11, 12 y 13. En estos cuadros se reportan los coeficientes de regresión de los modelos obtenidos para los términos lineales (X_1 y X_2), cuadráticos (X_1^2 y X_2^2) e interacciones ($X_1 * X_2$), sus probabilidades respectivas para cada una de las variables de respuesta y los coeficientes de determinación (R^2) de cada modelo. La R^2 indica que tanto de la variación total de la variable respuesta es explicada por el modelo matemático ajustado. El efecto de cada factor sobre las variables de respuesta, fue determinado en base a la intensidad de cada coeficiente de regresión en el modelo y su probabilidad asociada. El signo positivo significa, que por cada unidad de incremento de la variable independiente la variable de respuesta también aumenta mostrando una relación positiva entre la respuesta y el factor, mientras que el signo negativo representa la relación inversa entre el factor y la respuesta (Montgomery, D.C., 2003).

Análisis proximal. Al realizar el análisis de regresión, la única variable que se mostró significativa ($P < 0.05$) fue la proteína en su forma lineal de X_2 (Soya) mostrando una relación directamente proporcional con la variable de respuesta (Figura 2). El modelo tuvo una R^2 de 0.90, lo que indica que el 90% de la variabilidad de los datos obtenidos puede ser explicada por el modelo (Tabla 11).

Las variables de humedad, grasa y ceniza no se encontraron significativas ($P > 0.05$), por lo cual la variable de respuesta proteína fue la determinante para el modelo seleccionado para la composición proximal de las salchichas de calamar.

Análisis fisicoquímicos. En la Tabla 12 se muestra los modelos de regresión para cada variable de los análisis fisicoquímicos. Las variables que se encontraron significativas fueron: CRA, dureza, elasticidad, EC y PD.

Tabla 11. Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para el análisis proximal de las salchichas de calamar gigante.

VARIABLES	R ²	B ₀	B ₁ X ₁	B ₂ X ₂	B ₁₁ X ₁ ²	B ₂₂ X ₂ ²	B ₁₂ X ₁₂
HUMEDAD	0.622	79.638 (<.0001*)	-0.478 (0.159)	-0.509 (0.096)	-0.308 (0.363)	-0.323 (0.214)	-0.378 (0.295)
GRASA	0.402	1.658 (0.0094*)	0.013 (0.886)	-0.008 (0.924)	-0.026 (0.796)	0.001 (0.991)	-0.134 (0.099)
PROTEINA	0.900	9.292 (<.0001*)	-0.064 (-0.31)	0.400 (0.0001*)	-0.077 (-0.26)	-0.063 (-0.21)	
CENIZA	0.344	2.292 (0.0001*)	-0.015 (0.783)	0.006 (0.896)	0.058 (0.250)	0.071 (0.209)	0.003 (0.957)

B₀= Intercepto

B₁X₁= Coeficiente de regresión lineal para X₁ (almidón).

B₂X₂= Coeficiente de regresión lineal para X₂ (soya).

B₁₁X₁² = Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₁

B₂₂X₂² = Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₂

B₁₂X₁₂ = Coeficiente de regresión para la interacción de los factores.

Entre paréntesis se muestra la probabilidad asociada a cada coeficiente estimado del modelo

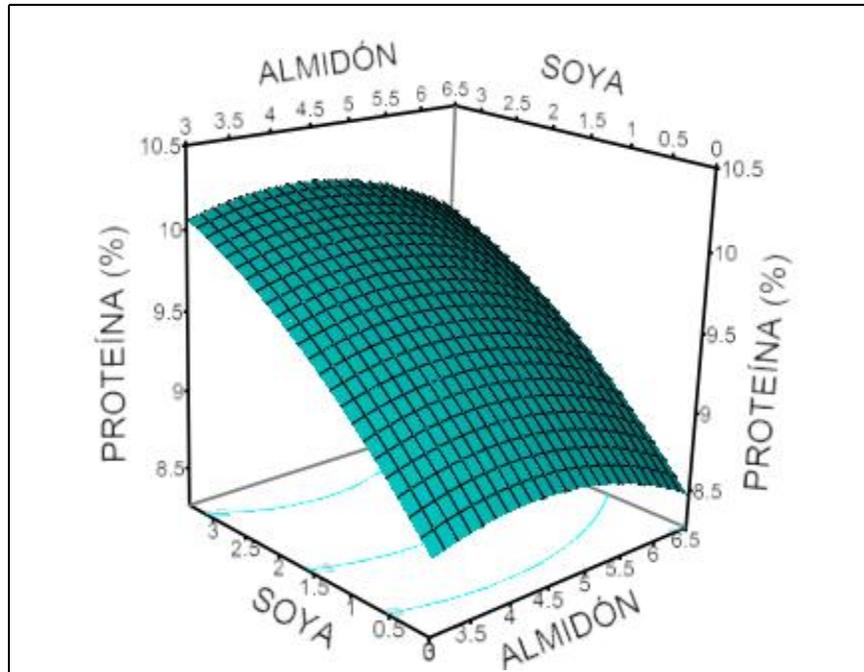


Figura 2. Gráfica de superficie de respuesta del efecto de Almidón y Soya sobre el contenido de proteína de las salchichas de calamar.

Tabla 12. Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para las características físico-químicas de las salchichas.

VARIABLES	R ²	B ₀	B ₁ X ₁	B ₂ X ₂	B ₁₁ X ₁ ²	B ₂₂ X ₂ ²	B ₁₂ X ₁₂
a_w	0.714	0.940 (<.0001*)	-0.0004 (0.854)	0.005 (0.0375)	0.004 (0.152)	-0.0003 (0.855)	-0.006 (0.069)
pH	0.483	6.575 (<.0001*)	-0.029 (0.585)	-0.016 (0.729)	-0.015 (0.790)	0.084 (0.078)	-0.014 (0.816)
CRA	0.839	79.780 (<.0001*)	2.604 (0.011*)	1.603 (0.045*)	-1.524 (0.094)	-1.550 (0.035*)	1.036 (0.248)
P. D	0.729	4.608 (<.0001*)	0.000 (0.999)	-0.072 (0.242)	0.266 (0.005*)		0.091 (0.247)
ELASTICIDAD	0.635	77.122 (<.0001*)	1.649 (0.172)	-0.602 (0.539)	0.705 (0.430)	-0.084 (0.942)	3.078 (0.040*)
COHESIVIDAD	0.257	30.717 (0.086)	0.558 (0.858)	3.352 (0.243)	1.405 (0.569)	0.232 (0.943)	1.073 (0.757)
DUREZA	0.822	-0.190 (0.699)	0.306 (0.015*)	0.362 (0.003*)		-0.097 (0.362)	0.178 (0.140)
EC	0.722	0.025 (0.561)	0.009 (0.268)	0.026 (0.007*)	-0.006 (0.499)	0.010 (0.146)	

B₀= Intercepto

B₁X₁= Coeficiente de regresión lineal para X₁ (almidón).

B₂X₂= Coeficiente de regresión lineal para X₂ (soya).

B₁₁X₁² = Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₁

B₂₂X₂² = Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₂

B₁₂X₁₂ = Coeficiente de regresión para la interacción de los factores.

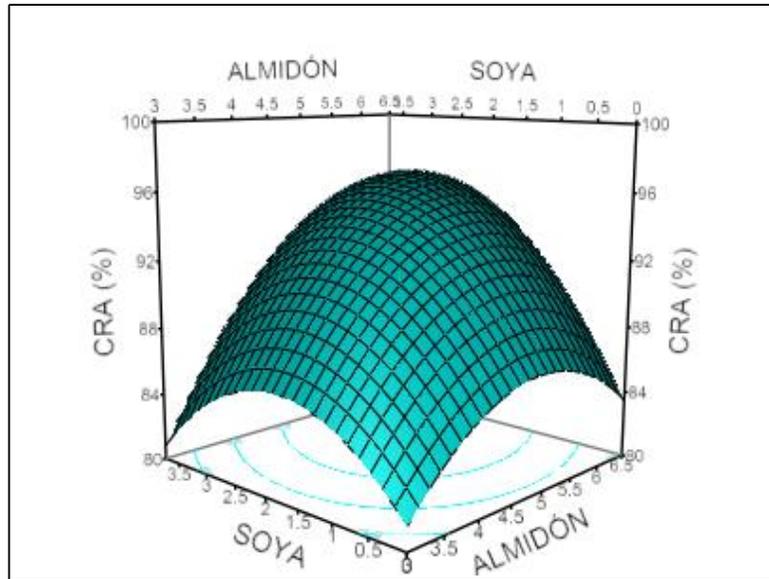
Entre paréntesis se muestra la probabilidad asociada a cada coeficiente estimado del mode

CRA. Para la capacidad de retención de agua se encontró un modelo con efecto significativo ($P < 0.05$) de la forma cuadrática X_2^2 , observándose un incremento positivo sobre la forma lineal y un decremento en la forma cuadrática sobre CRA (Figura 3), contribuyendo en mayor proporción X_1 , con un coeficiente de regresión más alto (2.604) y una probabilidad menor (0.011). La R^2 estimada fue de 0.839, por lo que el modelo explica el 83.9% de la varianza de esta variable de respuesta.

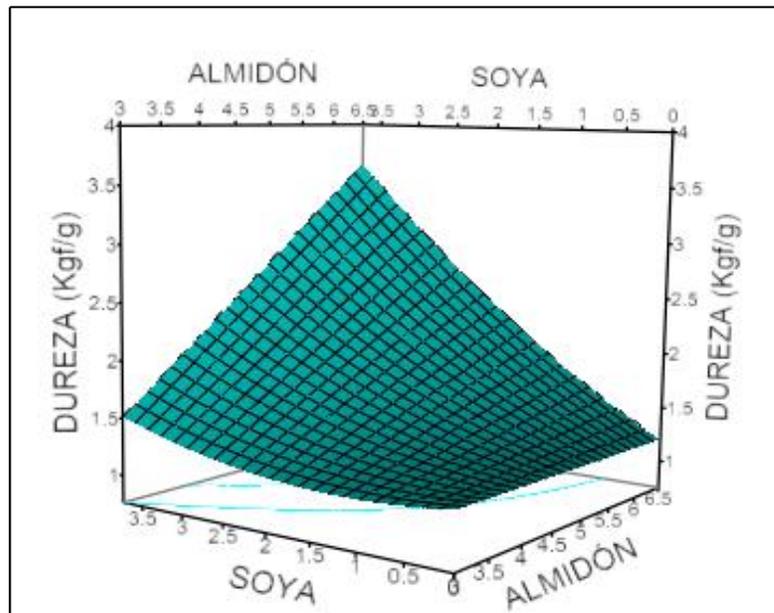
Textura. Las variables dureza, elasticidad mostradas por el APT y EC, son las que resultaron significativas ($P < 0.05$). Para el caso de dureza, el modelo incluyó el efecto lineal de X_1 (almidón) y X_2 (soya), contribuyendo en mayor proporción X_2 (3.62) con una probabilidad menor (0.003), y este modelo presentó un coeficiente de determinación de 0.82, lo que reafirma que estos ingredientes contribuyen a mejorar la textura de este producto (Figura 3). La elasticidad tuvo un efecto significativo de la interacción $X_1 * X_2$ (almidón*soya), misma que contribuye positivamente, es decir el efecto interactivo indica que el efecto del almidón sobre la elasticidad es dependiente del contenido de soya (Figura 4). Sin embargo este modelo solo explicó en un 63.5% la variabilidad de los datos, por lo que no se considera un buen predictor. Por último, el esfuerzo al corte se vio influenciado por la forma lineal de X_2 (soya) con una relación positiva (Figura 4), explicando el modelo en un 72.2% la variabilidad de los datos.

En cuanto a la prueba de doblado se mostró efecto ($P < 0.05$) de la forma cuadrática de almidón X_1^2 , con una relación positiva. El modelo explicó en un 74.9% la variabilidad de los datos. Los efectos se pueden observar en la Figura 4. Por otro lado la variable cohesividad no fue afectada ($P > 0.05$) por ninguna de las formas lineales, cuadrática o interacción de los factores estudiados.

Análisis Sensorial. En la Tabla 13, se muestran la contribución de los factores sobre las variables de respuesta de evaluación sensorial. La variable textura al masticar fue afectada ($P < 0.05$) por la forma lineal X_2 (soya), contribuyendo negativamente. El modelo presentó una R^2 de 0.716. Esta relación inversa de la

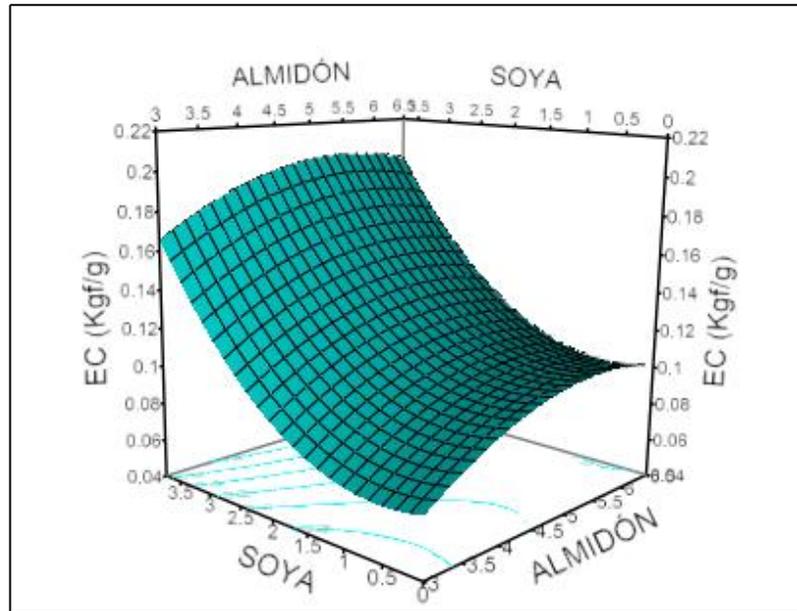


(a)

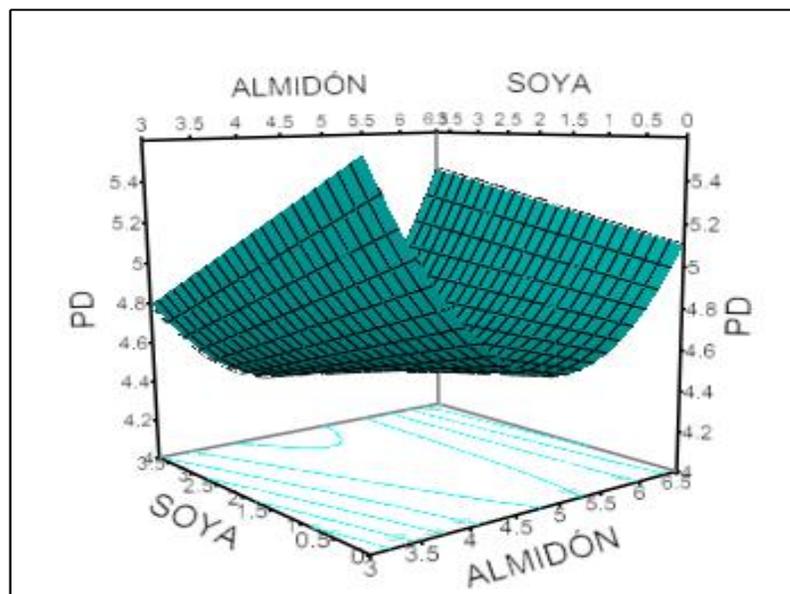


(b)

Figura 3. Gráfica de superficie de respuesta para las variables fisicoquímicas. Efecto de almidón y soya sobre la CRA (a) y la dureza (b).



(a)



(b)

Figura 4. Gráfica de superficie de respuesta para las variables fisicoquímicas. Efecto de almidón y soya sobre Esfuerzo al corte (a) y Prueba de Doblado (b).

Tabla 13. Modelos predictivos obtenidos por superficie de respuesta para la evaluación sensorial de las salchichas.

VARIABLES	R ²	B ₀	B ₁ X ₁	B ₂ X ₂	B ₁₁ X ₁ ²	B ₂₂ X ₂ ²	B ₁₂ X ₁₂
APARIENCIA	0.504	6.820 (0.0067*)	0.430 (0.247)	-0.477 (0.153)	-0.258 (0.363)	0.277 (0.485)	-0.296 (0.432)
COLOR	0.592	6.538 (0.0128*)	0.492 (0.235)	-0.500 (0.174)	-0.251 (0.546)	-0.518 (0.126)	0.535 (0.244)
SABOR	0.440	6.007 (0.0377*)	0.536 (0.279)	-0.597 (0.179)	-0.195 (0.696)	-0.378 (0.325)	0.030 (0.954)
TEXTURA AL MORDER	0.650	-1.107 (0.870)	3.846 (0.207)	-0.023 (0.989)	-0.430 (0.194)	-0.082 (0.722)	-0.093 (0.776)
TEXTURA AL MASTICAR	0.716	9.024 (0.0001*)	-0.246 (0.344)	-0.75 (0.0089*)	-0.476 (0.104)	-0.074 (0.708)	

B₀= Intercepto

B₁X₁= Coeficiente de regresión lineal para X₁ (almidón).

B₂X₂= Coeficiente de regresión lineal para X₂ (soya).

B₁₁X₁²= Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₁

B₂₂X₂²= Coeficiente de regresión para el término cuadrático de X₂

B₁₂X₁₂= Coeficiente de regresión para la interacción de los factores.

Entre paréntesis se muestra la probabilidad asociada a cada coeficiente estimado del modelo

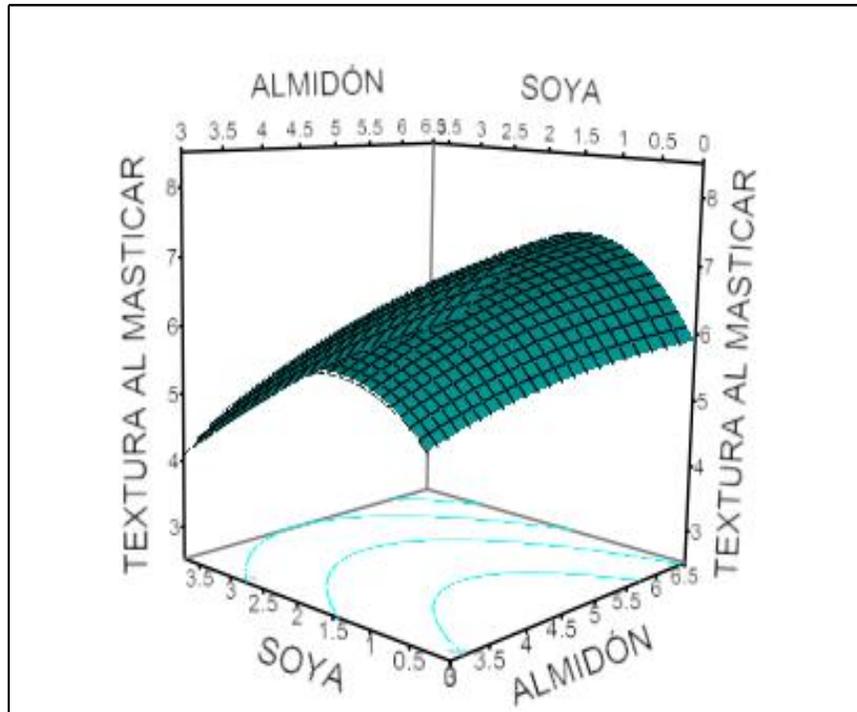


Figura 5. Gráfica de superficie de respuesta para la evaluación sensorial. Efecto de almidón y soya sobre la textura al masticar.

soya con el parámetro de textura al masticar, es debido a que los panelistas detectaron en 2 puntos centrales puntuaciones más altas (es decir textura blanda) y en los otros 2 puntos centrales las calificaron con una textura ideal. Por otro lado el efecto de sabor, color, apariencia y textura al morder, no se vieron afectados ($P > 0.05$) por la presencia de los factores.

Respuesta Óptima

Debido a que algunas variables no se presentaron en los mismos niveles de los factores, se seleccionaron algunos parámetros de mayor influencia para la textura del producto, además de descartar los modelos que se mostraron significativos y que la R^2 que presentaron fue inferior a 0.70. Las variables seleccionadas fueron proteína, CRA, textura al masticar, dureza y EC. Es importante hacer mención que los niveles óptimos para algunas variables afectaban la respuesta óptima de otras variables, por lo que se optó por colocar en los puntos centrales los factores y observar la respuesta en cada uno de los modelos que se seleccionaron como predictivos. En las figuras 6 y 7 las líneas verticales en rojo indican la solución óptima para almidón y soya (valor debajo de la figura) y las líneas horizontales rojas condiciones óptimas de las variables de respuesta (valor a un costado de la figura). Se puede ver que se logró un equilibrio en las variables mostrando una respuesta tecnológicamente aceptable, por lo que se decidió tomar esas condiciones como óptimas para nuestro producto y realizar una validación de la formulación para corroborar que efectivamente se obtendrá un producto con las características predichas.

Validación del Modelo Predictivo

Con el fin de comprobar la validez del modelo, se utilizaron las condiciones óptimas de la formulación que se obtuvieron mediante la manipulación de los perfiles predictivos del modelo obtenido. La verificación del modelo para las variables respuesta se llevó a cabo mediante una prueba de "t" pareada a un nivel de significancia de $P < 0.05$. En la tabla 14 se puede observar que a

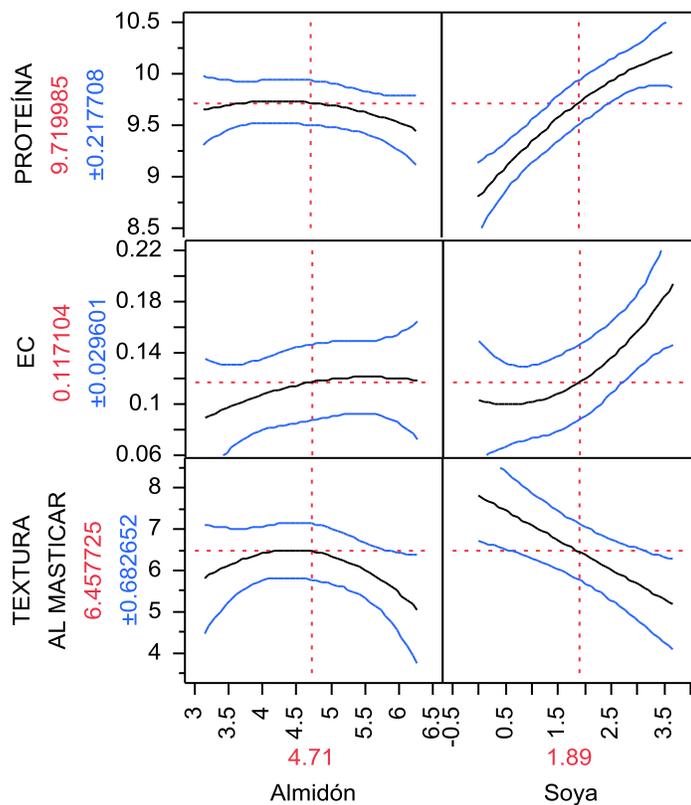


Figura 6. Perfiles de predicción de respuesta óptima para los niveles de almidón y soya en los puntos centrales para proteína, EC y textura al masticar.

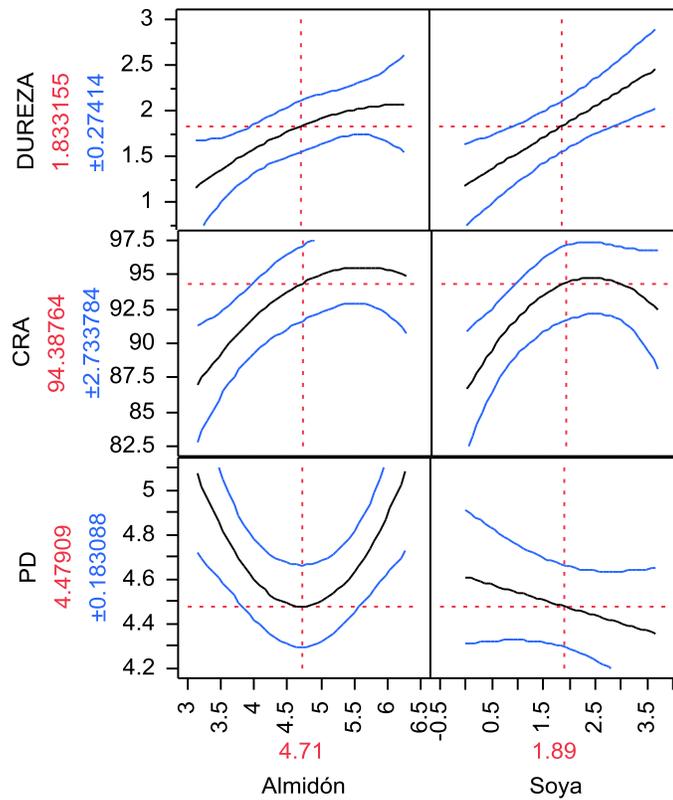


Figura 7. Perfiles de predicción de respuesta óptima para los niveles de almidón y soya en los puntos centrales para dureza, CRA y PD.

Tabla 14. Valores predichos y experimentales del modelo.

Variables	Valores	
	Predichos	Experimentales
Proteína	9.71	10.04
CRA	94.5	95.31
Dureza	1.83	1.9
EC	0.11	0.11
Textura al masticar	6.45	6.4
Prueba de doblado	4.48 ^a	4.83 ^b

Diferente literal en la misma fila indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

excepción de la prueba de doblado, las demás variables de respuesta (proteína, dureza, CRA, EC y textura al masticar) no presentaron ninguna diferencia ($P>0.05$) entre los valores predichos por los modelos y lo obtenido experimentalmente, lo que conduce a decir que las condiciones óptimas obtenidas son las adecuadas mejorar las características físico-químicas y sensoriales de este producto.

Conclusiones Etapa I

- En general, se encontró que la forma lineal X_2 (soya) fue el efecto que más contribuyó, ya sea aumentando o disminuyendo las respuestas, evidenciándose en el análisis proximal, fisicoquímicos y sensoriales.
- Los perfiles de predicción de respuesta óptima para los niveles de almidón y soya en la salchicha de calamar, fueron determinados por las variables de respuesta: proteína, CRA, EC, dureza y textura al masticar.
- Todas las variables seleccionadas fueron llevadas a los puntos centrales del diseño sin afectar el producto tecnológicamente, tomando así como óptimo estos niveles de los factores.

Etapa II: Elección de Antimicrobiano Natural

Composición Proximal

La humedad de las formulaciones al día cero sus valores oscilaron entre 75.44%-76.34% (Tabla 15). Los valores se encuentran por encima (70%) de lo recomendado por la norma mexicana NMX-F-065-1984 y por lo reportado para salchichas provenientes de productos cárnicos (Jimenez-Colmero et al., 2010), sin embargo, la humedad de este producto concuerda con lo reportado en estudios previos para salchicha de calamar cuyo valor de humedad fue 75.76% (Felix-Armenta et al., 2009). Cabe hacer mención que las salchichas que se ajustan a lo recomendado por la norma mexicana, provienen de materia prima de especies tradicionales (porcinos, avícolas, etc.), cuya humedad oscila de 70 a 78%. Estudios previos muestran que la humedad de músculo de calamar puede ser mayor a las materias primas de referencia y que pueden variar de 81% a 86% (De la Fuente-Betancurt et al., 2009; Félix-Armenta et al., 2009) por tanto valores altos de humedad en la materia prima pueden reflejar mayores contenidos de humedad en el producto terminado.

La proteína de las formulaciones fueron de 10.94 a 11.52% (Tabla 15). Estos valores concuerdan con lo reportado por Félix-Armenta et al. 2009 encontrándose por debajo de lo reportado para salchicha de atún con carne de res (15%) y salchicha de cachama (*Colossoma macropomum*) con res (13%) (García et al., 2005; Izquierdo et al., 2007) sin embargo, los valores están por encima de los recomendados por la NMX-F-065-1984 para salchichas (9.5%). Es importante mencionar que en un estudio realizado por la PROFECO (2005) se observaron valores mínimos de hasta 5.8% de proteína en salchichas comerciales, siendo inferiores a lo reportado por este estudio. Por lo tanto este contenido de proteína de la salchicha de calamar la hace competitiva nutricionalmente.

El contenido de grasa se encontró entre 2.09%-2.77% (Tabla 15)

Tabla 15. Composición proximal de formulaciones de salchicha de calamar por efecto del antimicrobiano.

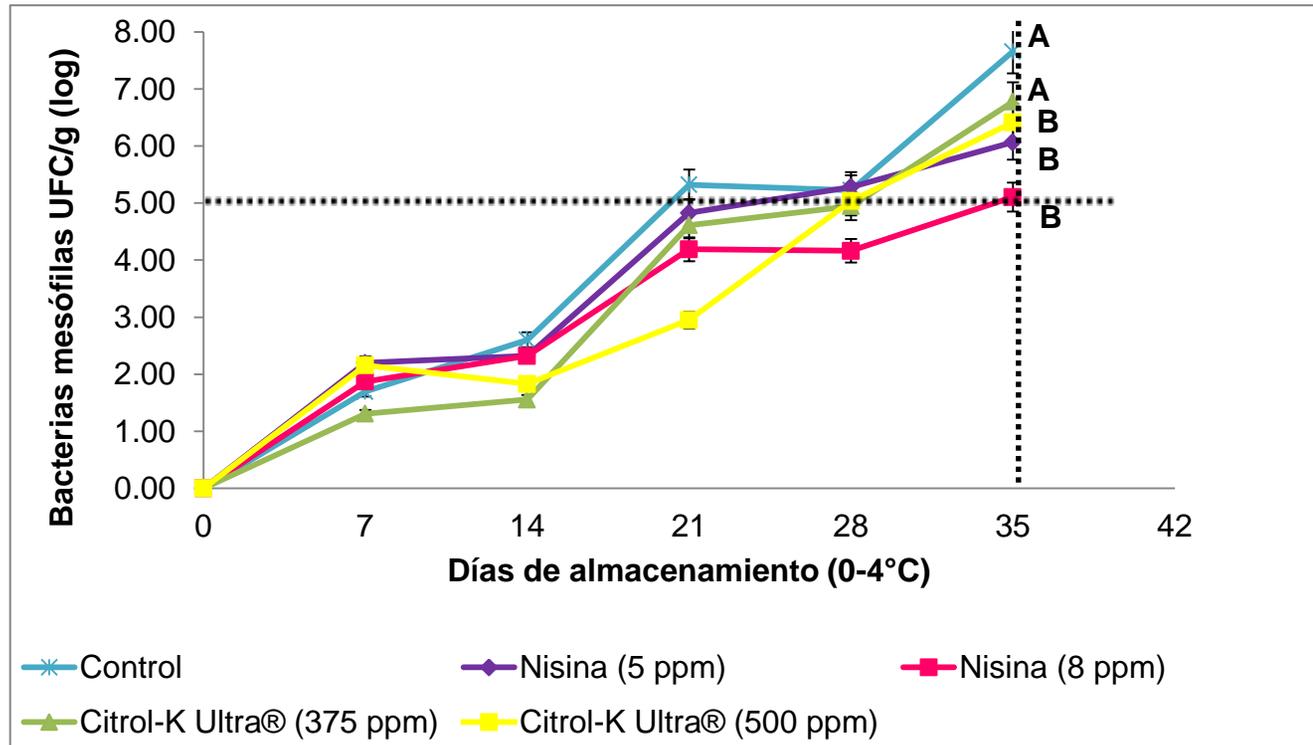
Análisis	Salchicha validación	Control	Nisina 5 ppm	Nisina 8 ppm	Citrol-K Ultra® 375 ppm	Citrol-K Ultra® 500 ppm	EEM
Humedad (%)	76.16	76.20	75.69	75.44	75.12	76.34	0.08
Proteína (%)	10.04	10.94	11.45	11.46	11.52	11.07	0.11
Grasa (%)	2.42	2.09	2.75	2.42	2.40	2.77	0.09
Cenizas (%)	2.85	2.67	2.61	2.69	2.84	2.68	0.05
Carbohidratos (%)	8.53	8.08	7.65	7.47	7.50	8.41	

Los valores corresponden a la media. EEM: error estándar de la media.

mostrándose muy por debajo de lo que muestran los límites permitidos (25%), por lo que este producto puede considerarse “bajo en grasa” de acuerdo con la NOM-086-SSA1-1994. Es importante resaltar que el calamar tiene un contenido muy bajo de grasa y la grasa presente en estas formulaciones es el aportado por los ingredientes, considerándose un punto nutricional favorable para este producto de valor agregado en estos tiempos actuales donde el consumidor prefiere alimentos bajos en grasa. El contenido de ceniza varió de 2.61%-2.84% (Tabla 15), estos resultados corresponden con lo reportado por (Félix-Armenta et al., 2009).

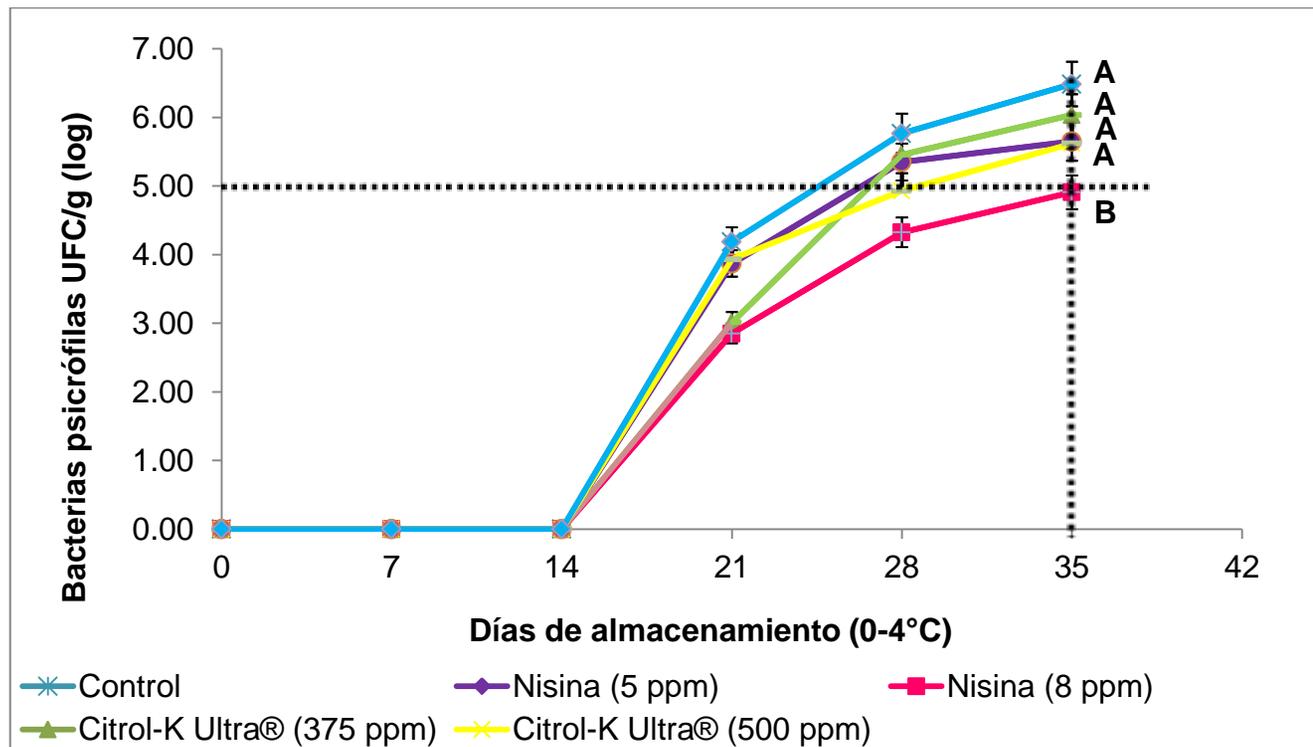
Evaluación Microbiológica

Los resultados, desde el punto de vista microbiológico de salchichas de calamar gigante mostraron un producto muy estable e inocuo durante 35 días de almacenamiento. Las bacterias aerobias (mesófilos y psicrófilos) muestran que el tratamiento Nisina (8 ppm) se encontró dentro de los límites permisibles (5log) por las normas (NOM-129-SSA1-1995), siendo las bacterias mesófilas las que mostraron el punto de corte al día 35 de almacenamiento (Figura 8 y Figura 9), mientras que los demás tratamientos alcanzaron su punto de corte al día 28. Estos resultados demuestran que nisina (8 ppm) puede ser un tratamiento efectivo para prolongar la vida de anaquel de salchichas de calamar comparado con los resultados reportados por Félix-Armenta et al. (2009), en el cual el producto tuvo una vida de anaquel por debajo de 21 días de almacenamiento. Raju et al. (2003), aplicó diferentes concentraciones de nisina (12.5 ppm, 25 ppm y 50 ppm) en salchicha de pescado y logró extender a 60 días su vida de anaquel. Los tratamientos formulados con nisina para salchicha de calamar presentaron una tendencia estable a través del tiempo, con esto se reafirma que la nisina es un antimicrobiano que en cantidades correctas es suficiente para disminuir y mantener estable (efecto bacteriostático) la población de psicrófilos Gram positivos (Mossel et al., 2003). Por otro lado, aunque los aceites esenciales cítricos tienen una actividad inhibitoria efectiva (Viuda-Matos et al., 2008; Fisher y Phillips, 2006), las concentraciones seleccionadas para el



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

Figura 8. Comportamiento de las bacterias mesófilas (media + error estándar de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

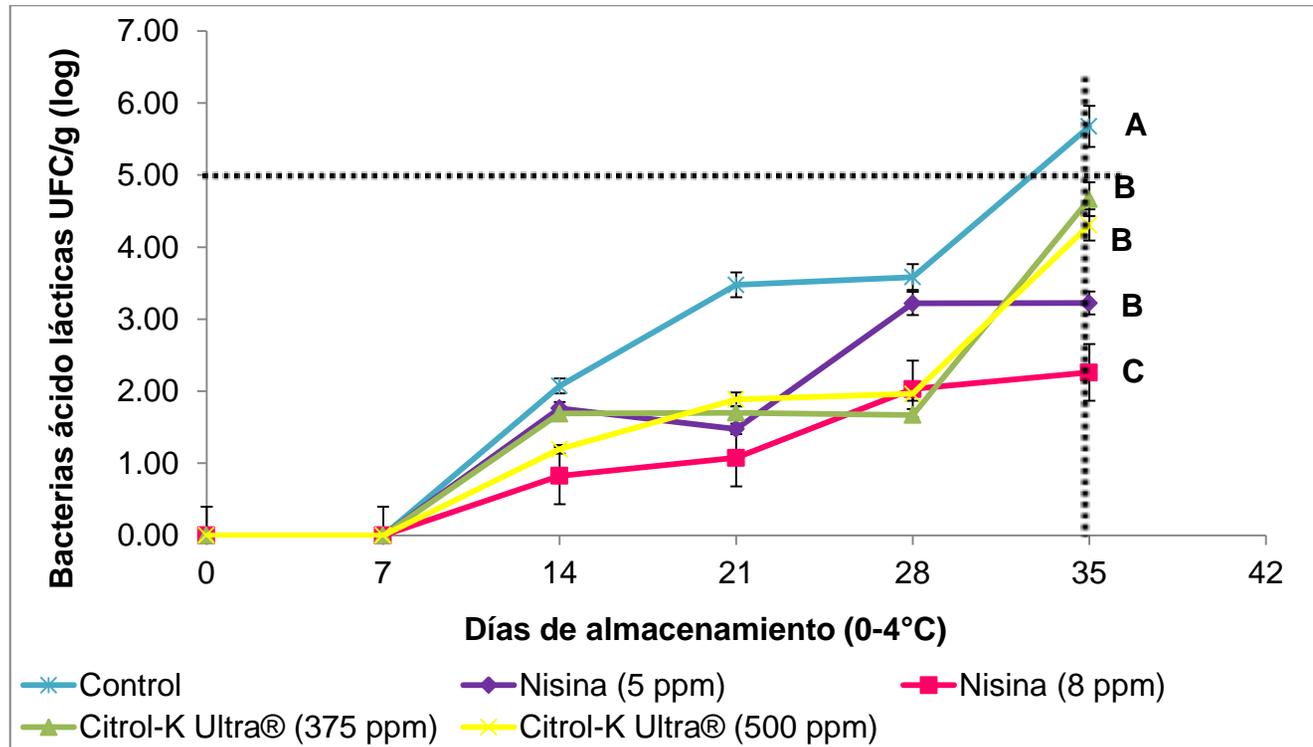
Figura 9. Cambios en la población de bacterias psicrófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.

presente estudio no lograron tener el efecto inhibitorio esperado para productos tipo salchicha de calamar. En la Figura 10, se puede observar que todos los tratamientos tuvieron un efecto ($P < 0.05$) bacteriostático sobre las bacterias ácido lácticas, sin embargo el tratamiento nisina (8 ppm), fue el que logró tener una mejor inhibición con respecto a los demás. Todos los tratamientos mostraron menor crecimiento de este tipo de bacterias que el control. El conteo de BAL estuvo por debajo de lo reportado en estudios para salchicha de calamar a 21 días de almacenamiento, (Félix-Armenta et al., 2009). Este mismo comportamiento se observó con respecto a lo reportado (10^6 y 10^8 UFC/g) en pescado empacado al vacío y ahumado por Lyhs, 2002. Lo que sugiere que nisina a 8 ppm puede ser un antimicrobiano de elección para este tipo de producto.

Evaluación Físico-química de las Salchichas

pH. El pH de los tratamientos y del control no mostraron diferencias ($P > 0.05$). Estos valores (6.21-6.27) muestran estabilidad del producto durante el almacenamiento (Figura 11), misma estabilidad que concuerda con lo reportado para los valores de pH 6.0-6.2 por Félix-Armenta et al. (2009). Contrario a los resultados del presente estudio, Raju et al. (2003), observaron diferencias de las salchichas con nisina vs control, observando una caída marcada del pH al día 30 de almacenamiento para el caso del control.

Actividad de Agua (a_w). Para la a_w los antimicrobianos lograron reducir este parámetro ($P < 0.05$) con respecto al control ($a_w = 0.97$), durante todo el almacenamiento como se muestra en la Figura 12. Estos valores del control concuerdan con los reportado por Vallejo-Córdoba et al. (1987) ($a_w = 0.97$) y Lecomte y Zayas (1993) ($a_w = 0.97-0.99$), para salchicha de pescado y de res con hidrolizado de soya respectivamente, sin el uso de antimicrobianos, por lo que se puede asumir que el uso de los antimicrobianos redujo la a_w en las salchichas de calamar.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

Figura 10. Cambios en la población de bacterias ácido lácticas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.

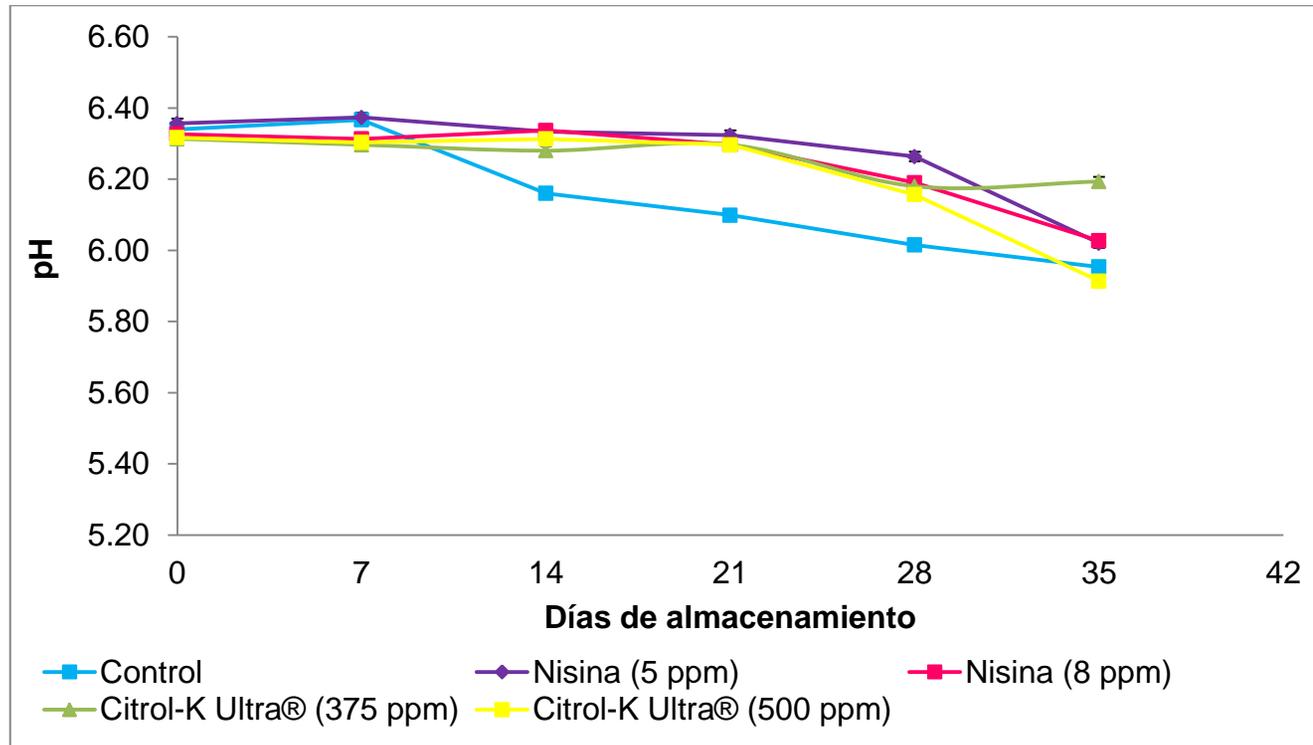
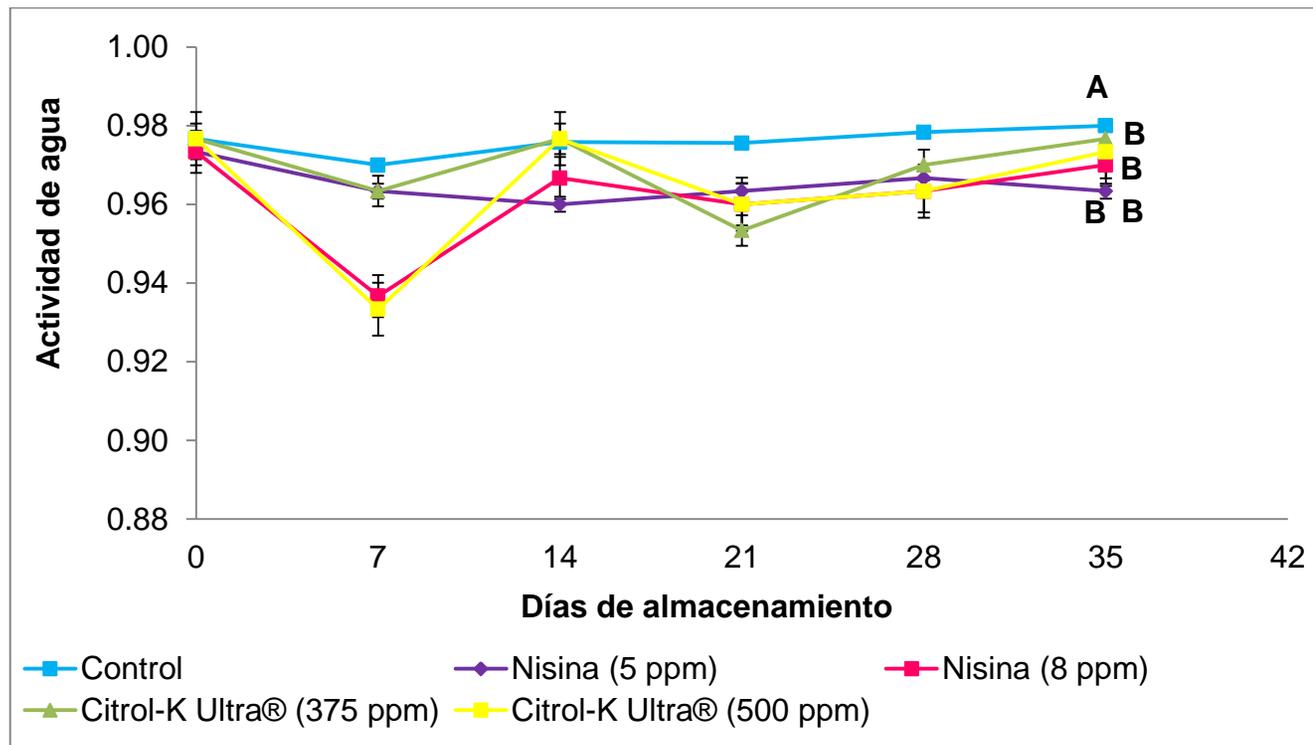


Figura 11. Porcentaje de pH (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 12. Actividad de agua (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.

Conclusiones Etapa II

- Los antimicrobianos naturales seleccionados no tuvieron efecto en el parámetro de pH, sin embargo redujeron los niveles de a_w .
- Nisina y Citrol-K Ultra® redujeron el crecimiento bacteriano, siendo nisina a 8 ppm el tratamiento más efectivo en mantener la inocuidad del producto durante 35 días, específicamente las bacterias mesófilas las que determinaron el punto de corte.
- Este estudio sugiere que la nisina en concentraciones de 8 ppm, es una opción de antimicrobiano natural que puede tener aplicación en la producción de salchichas de manto de calamar gigante para generar un producto de calidad y vida de anaquel prolongada.

Etapa III: Vida de Anaquel de Salchicha de Calamar

Composición Proximal

Estos análisis se realizaron con la finalidad de conocer la composición proximal inicial de los dos tratamientos (control y nisina 8 ppm) al día cero, la cual se muestra en la Tabla 16. En ella se puede observar que se obtuvieron valores similares ($P>0.05$) entre el control y la nisina 8 ppm a excepción de la ceniza la cual resultó con un valor ligeramente más alto en el control ($P<0.05$). Así mismo es importante hacer notar que la composición proximal para esta etapa es similar a la obtenida durante la validación y la reportada en la etapa II donde fue seleccionado el antimicrobiano (Tabla 15).

Humedad. De la composición proximal, la humedad fue el único parámetro evaluado durante el periodo de almacenamiento. Su comportamiento se muestra en la Figura 13, observándose similar (control y nisina 8 ppm) hasta el día 21, después de este día el control presentó una disminución en el contenido de humedad resultando diferentes ($P<0.05$) al día 42 de almacenamiento, por lo que la nisina 8 ppm mantiene estable la humedad durante todo el periodo en refrigeración.

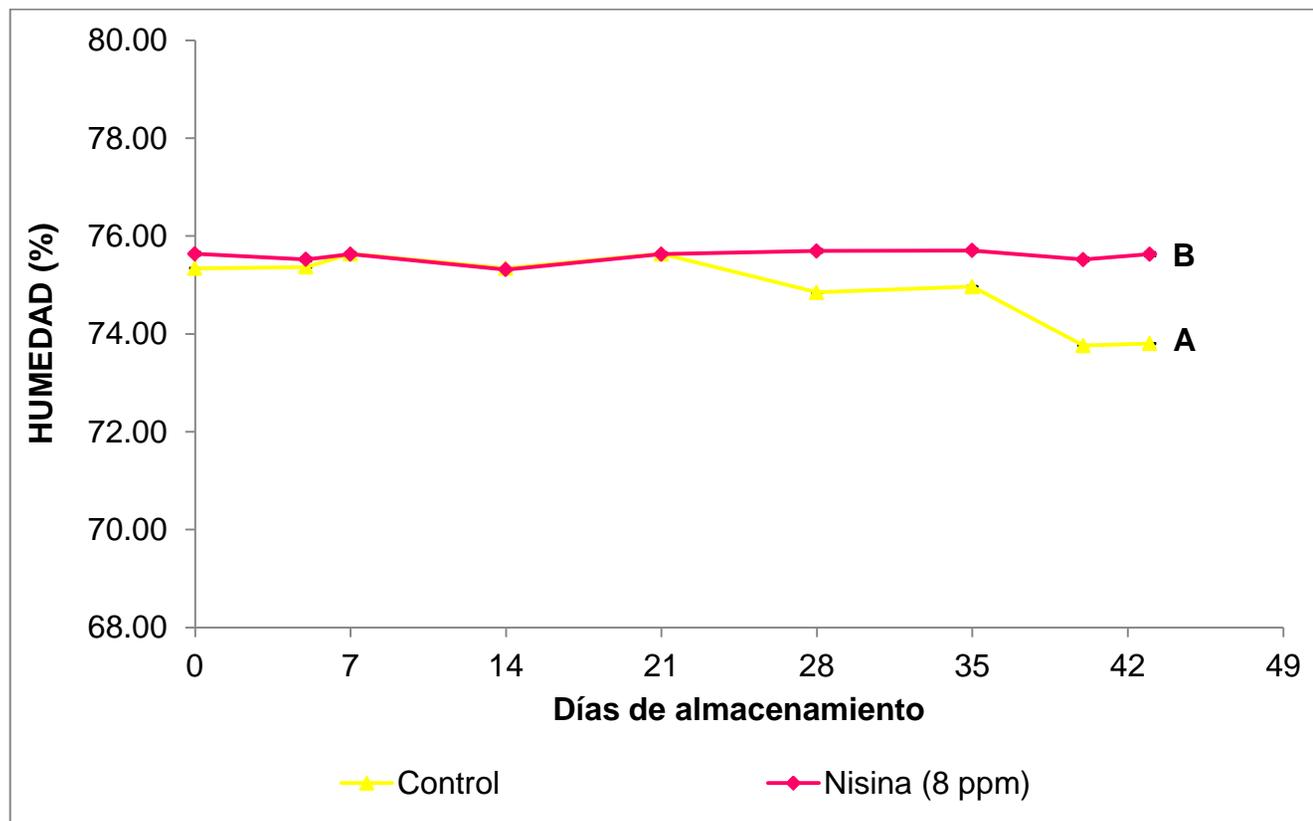
Evaluación de pH

En productos terminados el pH tiene influencia sobre algunas propiedades como de la capacidad de retención de agua, así como en el crecimiento de microorganismos (Badui, 1999). Los valores de pH se mantuvieron estables hasta el día 14 seguido de una acidificación por parte del tratamiento control lo que resultó diferente ($P<0.05$) mostrando un pH de 6.35 *versus* 6.43 del tratamiento con nisina (Figura 14). En la investigación realizada por Raju et al. (2003) se mostró un comportamiento similar, el tratamiento con nisina a diferentes concentraciones (12.5, 25 y 50 ppm) no afectó este parámetro mostrando estabilidad durante el almacenamiento, mientras que en el

Tabla 16. Composición proximal de formulaciones de salchicha de calamar.

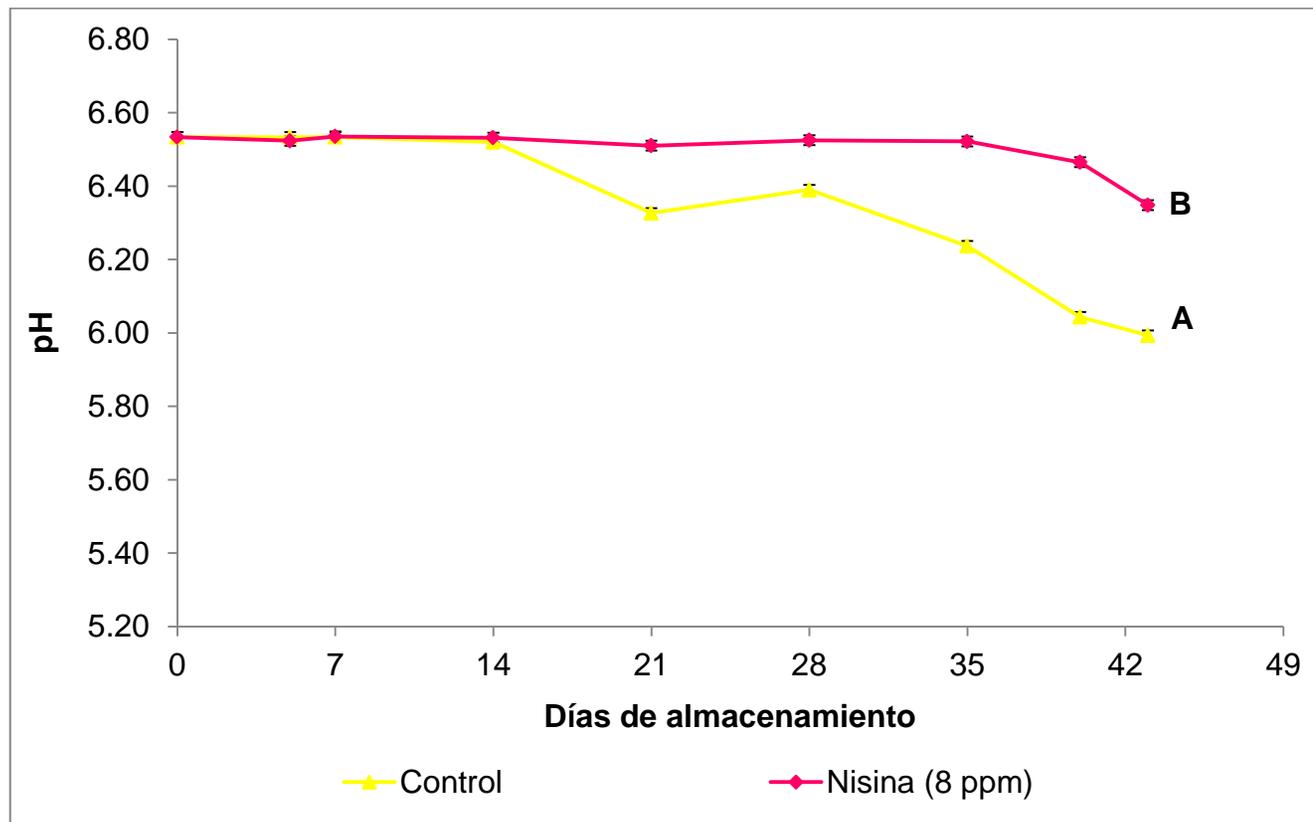
Análisis	Control	Nisina 8 ppm	EEM
Humedad (%)	75.34 ^a	75.53 ^b	0.270
Proteína (%)	10.6	10.53	0.020
Grasa (%)	2.3	2.25	0.007
Cenizas (%)	2.77 ^a	2.64 ^b	0.005
Carbohidratos (%)	8.99	9.05	

Los valores corresponden a la media. EEM: error estándar de la media.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 13. Cambios en el contenido de humedad (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 14. Cambios en el pH (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).

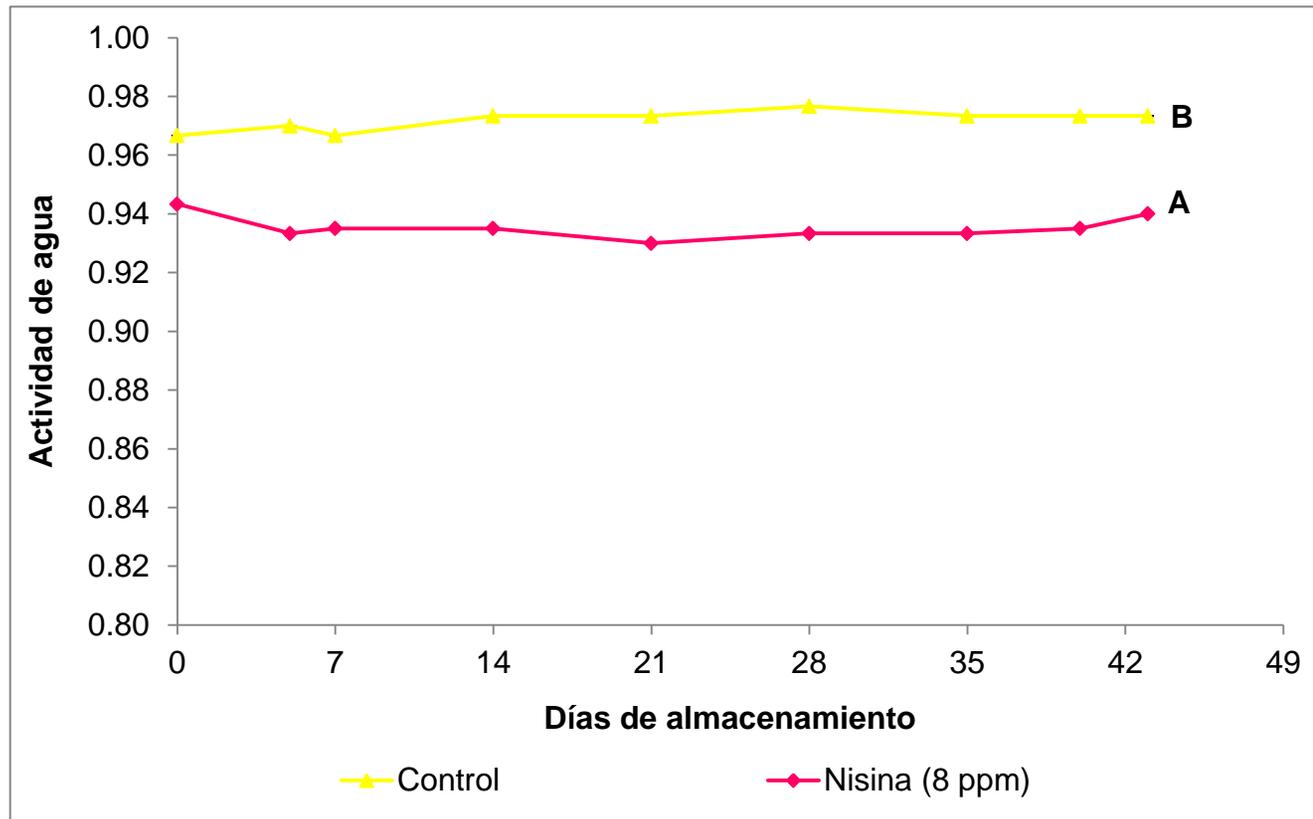
tratamiento control el pH decreció de 6.8 a 6.20, por lo que con este trabajo se evidencia que nisina a 8 ppm es suficiente para evitar la caída de pH durante el almacenamiento en refrigeración de las salchichas de calamar.

Evaluación de Actividad de Agua (a_w)

El monitoreo de la actividad de agua reflejó la estabilidad de las salchichas de calamar durante su almacenamiento, mientras los valores de a_w se acerquen a 1 el producto será más inestable (Badui, 2006). En el presente estudio, se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre a_w del tratamiento nisina 8 ppm (0.93) y el control (0.97). En la Figura 15, se observó que el tratamiento con nisina reduce significativamente la a_w , este mismo comportamiento se había observado en la etapa II (Figura 10). Lo que se podría traducir en que las salchichas con nisina presentan menor susceptibilidad al crecimiento microbiano lo cual se corroboró en las evaluaciones microbiológicas que se muestran a posterior en los resultados de esta etapa.

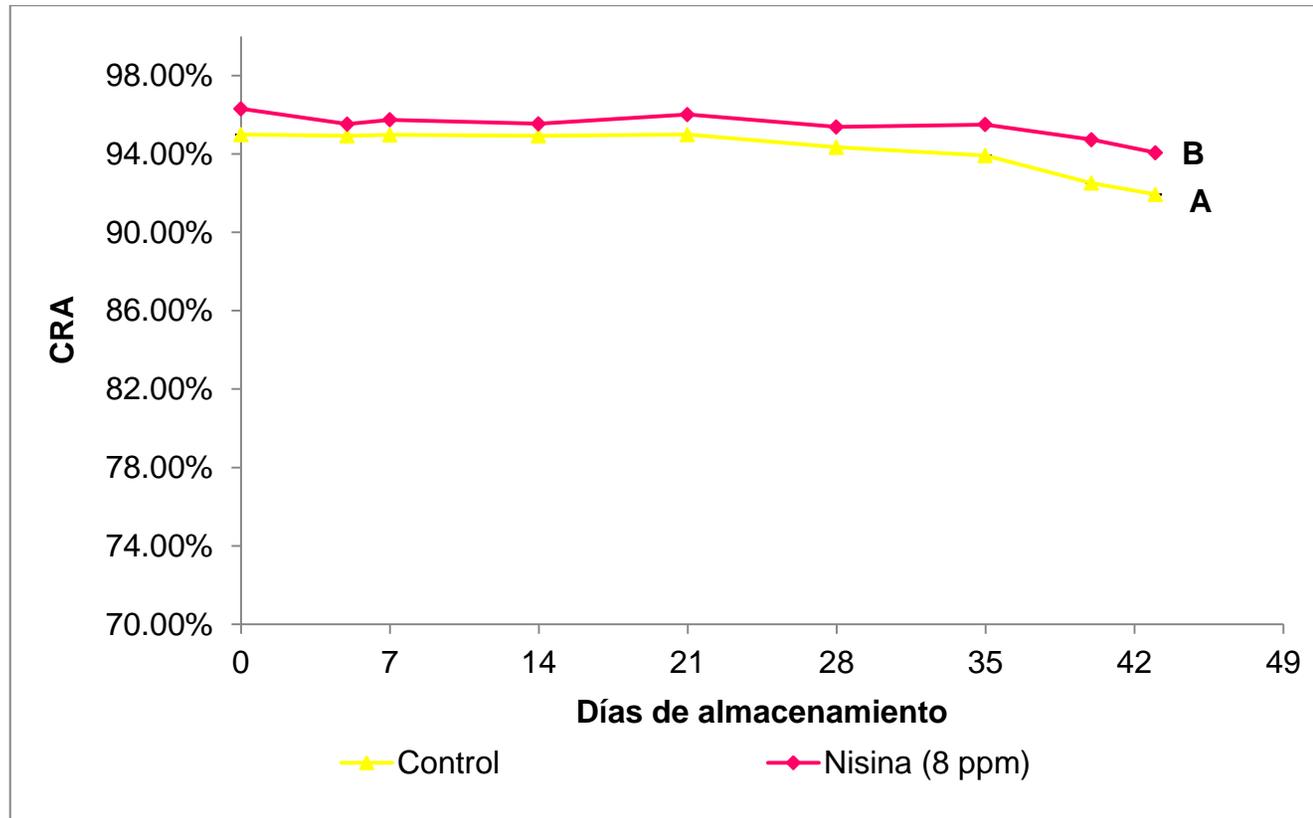
Evaluación de Capacidad de Retención de Agua

Una de las propiedades funcionales más utilizadas en la tecnología de alimentos, es la CRA. Ésta indica la cantidad de agua retenida por proteína después de filtrar y aplicar presión o fuerza centrífuga (Borderías y Montero, 1988). Este parámetro se mostró estable durante el almacenamiento (Figura 16), observándose diferencias ($P < 0.05$), presentando mayor CRA el tratamiento con nisina que la observada para el control donde se muestra una disminución en los últimos días de almacenamiento, misma disminución que se puede relacionar con el descenso en los valores observados en el parámetro de pH.



Diferente literal indican diferencias (P<0.05) por efecto del tratamiento

Figura 15. Cambios en actividad de agua (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 16. Porcentaje de capacidad de retención de agua (media \pm error estándar) de salchichas de calamar durante su vida de anaquel en refrigeración (2-4°C).

Evaluación de Textura

Los valores arrojados por el APT (dureza, cohesividad y elasticidad) se mantuvieron constantes ($P>0.05$) durante todo el almacenamiento (Figura 17, 18, 19). Estos resultados son muy favorables debido a que los ingredientes elegidos para la optimización de la fórmula permiten que este parámetro no se vea afectado durante la vida de anaquel.

Estevez, (2006) y Dincer y Claki, (2010), observaron en salchichas frankfurter adicionadas con antimicrobianos naturales, que al final del almacenamiento hay una disminución de la dureza, lo que atribuyeron a la relación que existe con la pérdida de humedad que sufrió el producto. Aunque en las salchichas de calamar se observó una disminución de la humedad, esta última no afectó la dureza del producto.

En el caso del esfuerzo al corte las salchichas de calamar mostraron estabilidad durante el almacenamiento para ambos tratamientos (Figura 20), sin embargo se lograron observar diferencias ($P<0.05$) entre los tratamientos con nisina ($0.13 \text{ kg}_F/\text{g}$) y control ($0.11 \text{ kg}_F/\text{g}$), no obstante estas diferencias no son relevantes desde el punto de vista tecnológico. Contrariamente a lo reportado por Félix-Armenta et al. (2009), los valores de EC fueron decreciendo durante el almacenamiento, siendo el parámetro de textura más afectado de este producto durante su estudio.

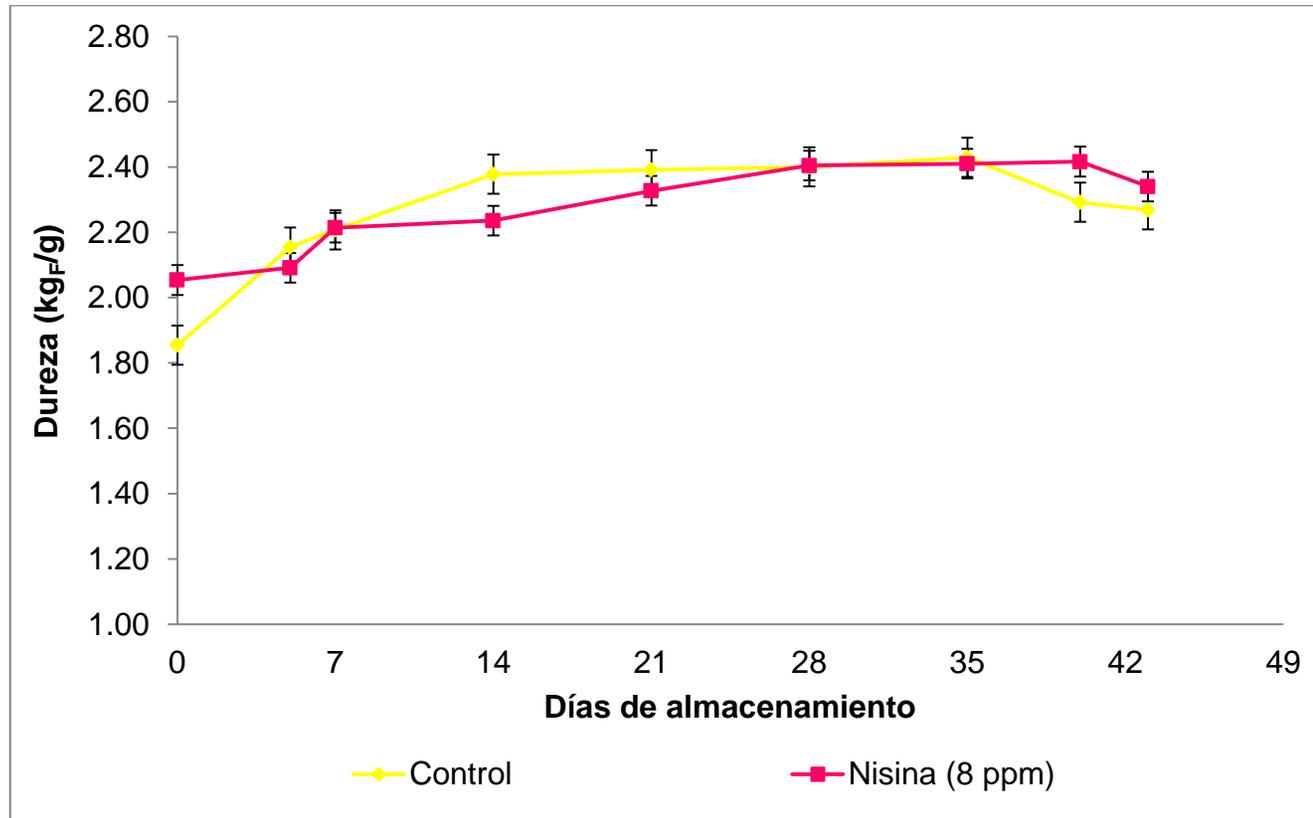


Figura 17. Valores de dureza (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración (0-4 °C).

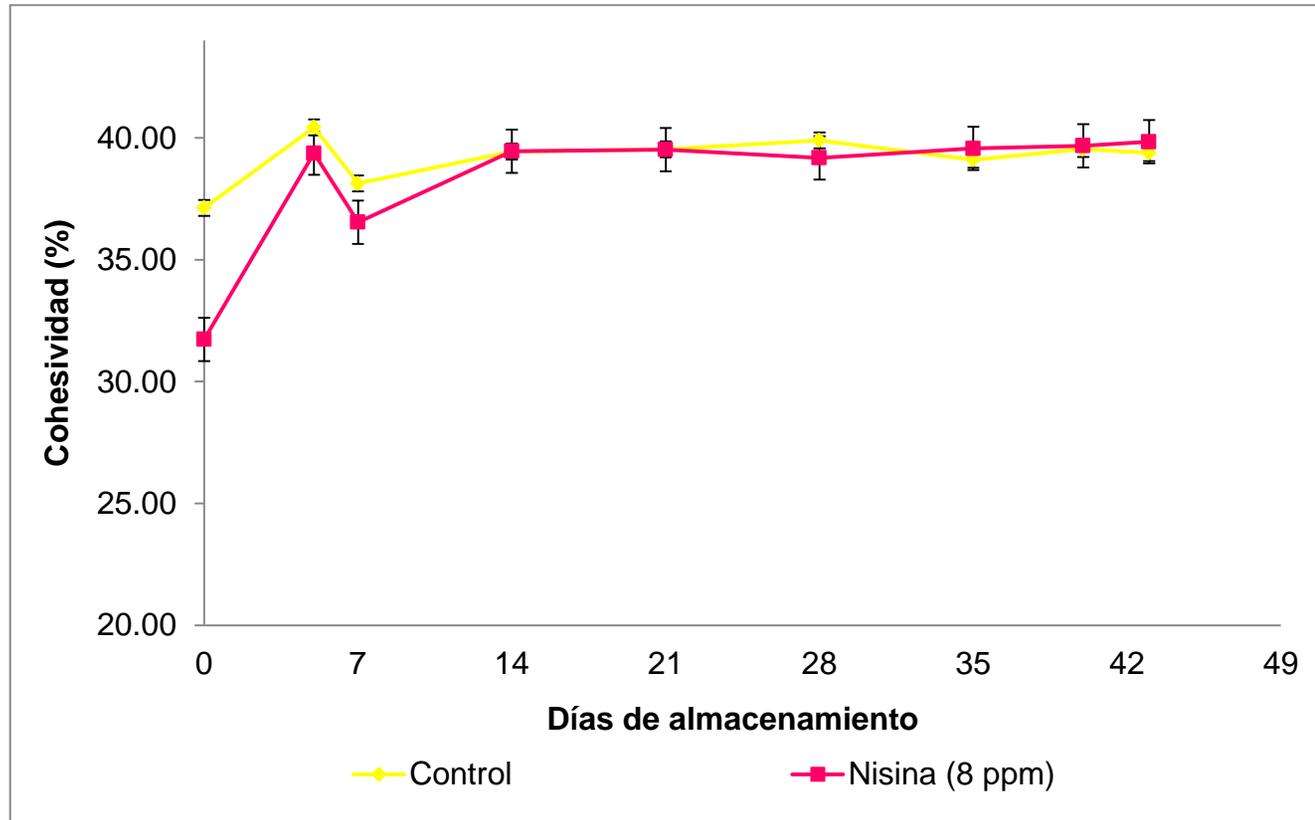
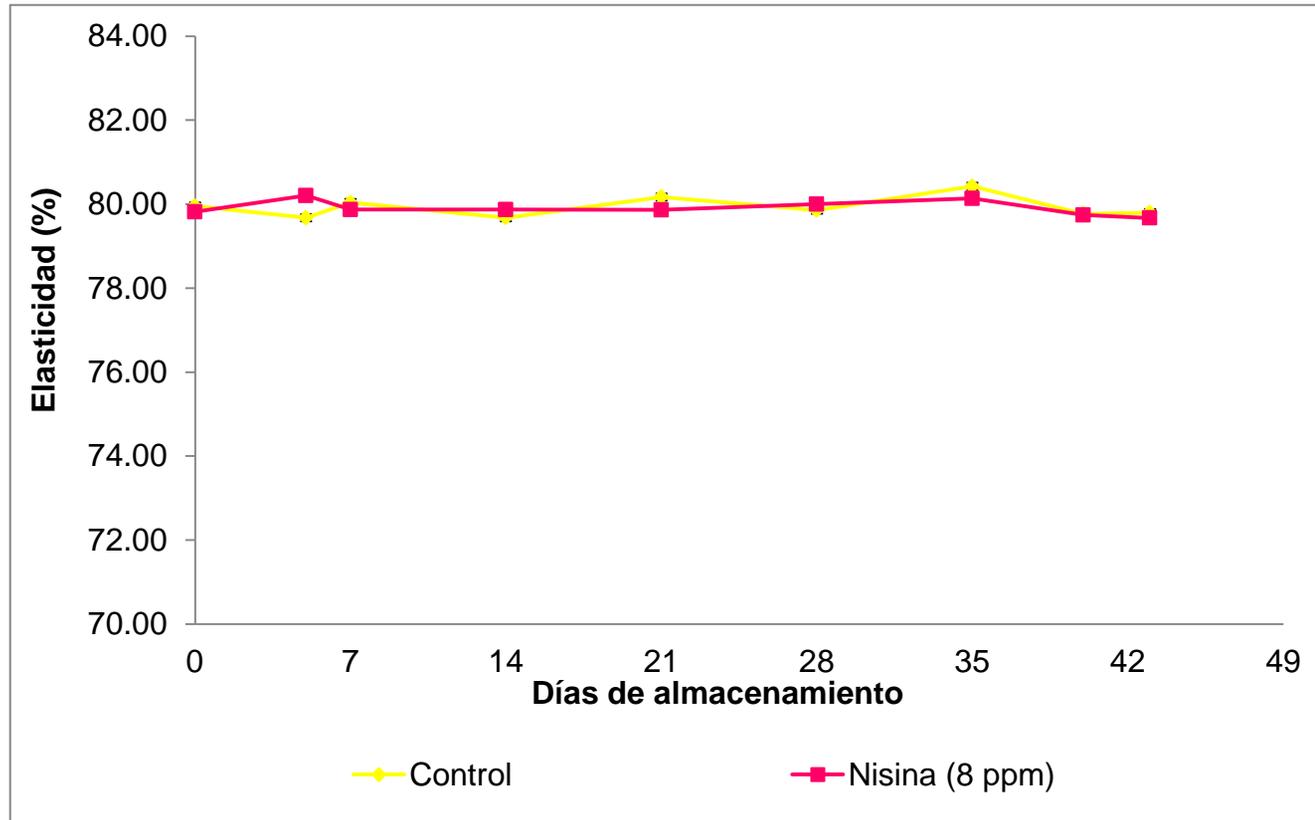
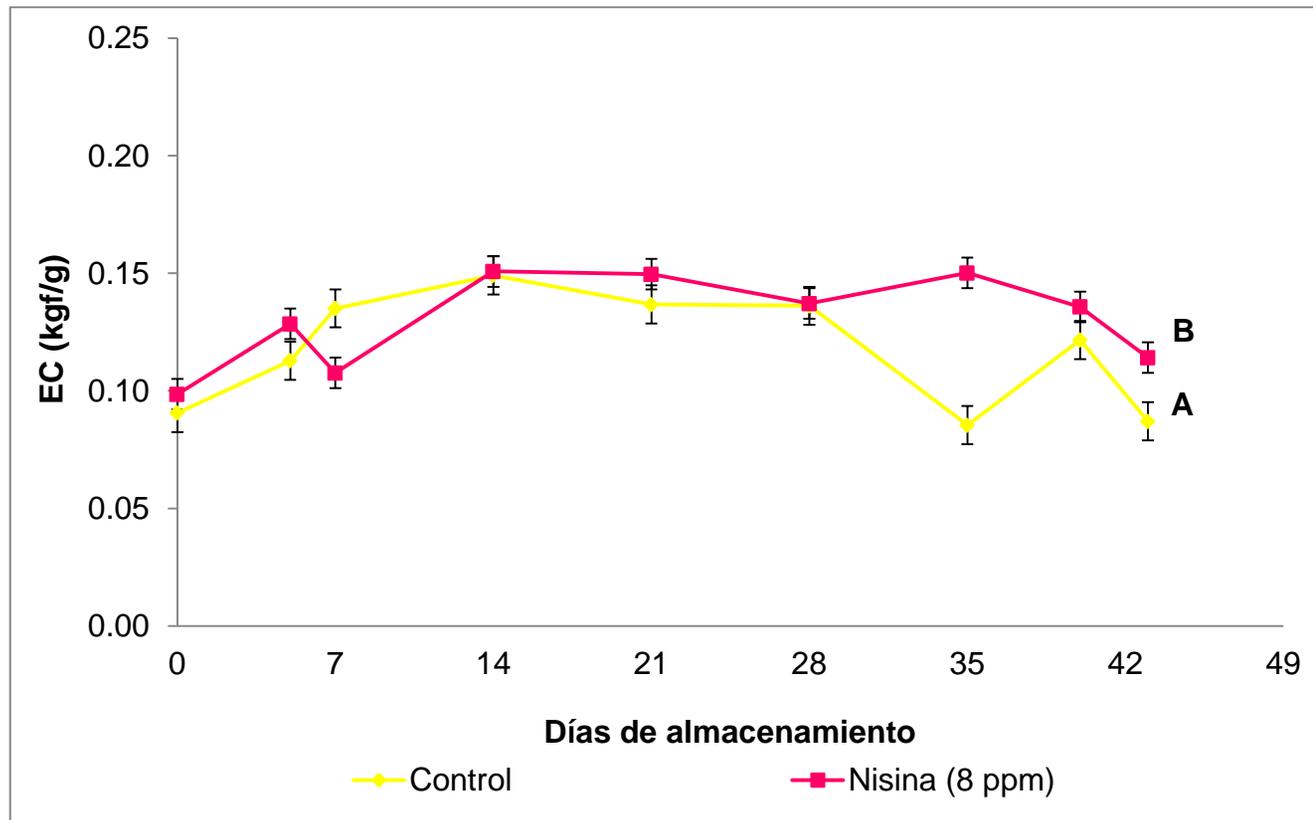


Figura 18. Porcentaje de cohesividad (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

Figura 19. Porcentaje de elasticidad (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

Figura 20. Valores de esfuerzo al corte (media + error estándar) de salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración (0-4 °C).

Análisis de Color

En la Tabla 17 se muestran los cambios de color interno de salchicha de calamar durante el almacenamiento. Para el parámetro de luminosidad (L^*) se observaron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamiento y control, siendo el control el que mostró cambios más marcados al disminuir su luminosidad durante el almacenamiento en refrigeración. Para el parámetro a^* (rojo-verde) el tratamiento con nisina resultó con valores mayores ($P < 0.05$) *versus* el control, pero ambos productos se ubicaron en el rango positivo de a^* , es decir, en tonalidades rojizas. Se ha reportado que la integridad estructural del alimento, el contenido, la disposición de pigmentos, así como la disponibilidad de agua en la superficie influyen directamente en este parámetro (Fernández-López et al., 2005). En el parámetro b^* (amarillo-azul) no se mostraron diferencias ($P > 0.05$) durante el almacenamiento.

En la Tabla 18, se muestran los cambios de color externo de las salchichas de calamar durante los 42 días de almacenamiento. Se observa que la luminosidad (L^*) y para el parámetro b^* externo de la salchicha de calamar se mantuvo estable durante el almacenamiento para ambos casos del control y el tratamiento con nisina, no se observaron diferencias ($P > 0.05$). Para el parámetro a^* resultó diferente ($P < 0.05$) el tratamiento con respecto al control, ya que este último presentó una disminución en su valor durante el almacenamiento.

Con respecto al ángulo de matiz (θ) tanto para el color interno como para el color externo el control obtuvo valores más altos ($P < 0.05$) (77.37 y 77.57) que el tratamiento con nisina de (75.51 y 75.69). Con estos resultados el producto se ubica el cuadrante I (rojo-amarillo) de la esfera cromática de color.

Tabla 17. Cambios de color interno de formulaciones de salchicha de calamar

Parámetro	Muestra	Días de almacenamiento								
		0	5	7	14	21	28	35	40	43
L*	Control ^a	77.86	78.75	78.26	80.34	79.04	77.84	76.57	76.74	77.27
	Nisina (8 ppm) ^b	77.78	78.77	78.64	79.44	78.29	78.29	78.18	77.5	78.08
a*	Control ^a	4.59	4.52	4.18	4.33	3.77	3.79	3.88	3.45	3.12
	Nisina (8 ppm) ^b	4.50	4.70	4.66	4.66	4.54	4.43	4.64	4.58	4.73
b*	Control	18.29	18.93	17.78	17.84	17.77	17.65	17.31	17.66	17.28
	Nisina (8 ppm)	18.57	18.31	15.34	18.25	17.35	17.61	17.74	17.51	17.57
Ángulo de matiz	Control ^a	75.91	76.58	76.77	76.38	78.03	77.89	77.35	78.97	79.75
	Nisina (8 ppm) ^b	76.39	75.11	75.19	75.68	75.34	75.87	75.33	75.35	76.17

Los valores corresponden a la media. Diferente literal indican diferencias (P<0.05) por efecto del tratamiento.

Tabla 18. Cambios de color externo de formulaciones de salchicha de calamar

		Días de almacenamiento									
Parámetro	Muestra	0	5	7	14	21	28	35	40	43	
L*	Control	74.85	75.51	76.55	77.97	75.00	76.33	74.39	75.47	75.79	
	Nisina (8 ppm)	74.99	76.18	76.16	77.52	75.69	75.66	75.68	75.35	75.43	
a*	Control ^a	5.44	5.68	5.28	5.22	4.57	4.40	4.56	4.10	4.43	
	Nisina (8 ppm) ^b	5.21	5.57	5.34	5.60	5.59	5.73	5.41	5.59	5.58	
b*	Control	22.74	22.69	20.49	22.6	21.72	21.86	20.9	20.53	21.30	
	Nisina (8 ppm)	22.24	22.03	21.42	22.28	21.17	21.39	21.47	21.12	21.46	
Ángulo de matiz	Control ^a	76.55	75.94	75.55	76.99	78.11	78.61	77.69	78.71	78.25	
	Nisina (8 ppm) ^b	76.82	75.8	75.83	75.9	75.2	75.01	75.86	75.17	75.43	

Los valores corresponden a la media. Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

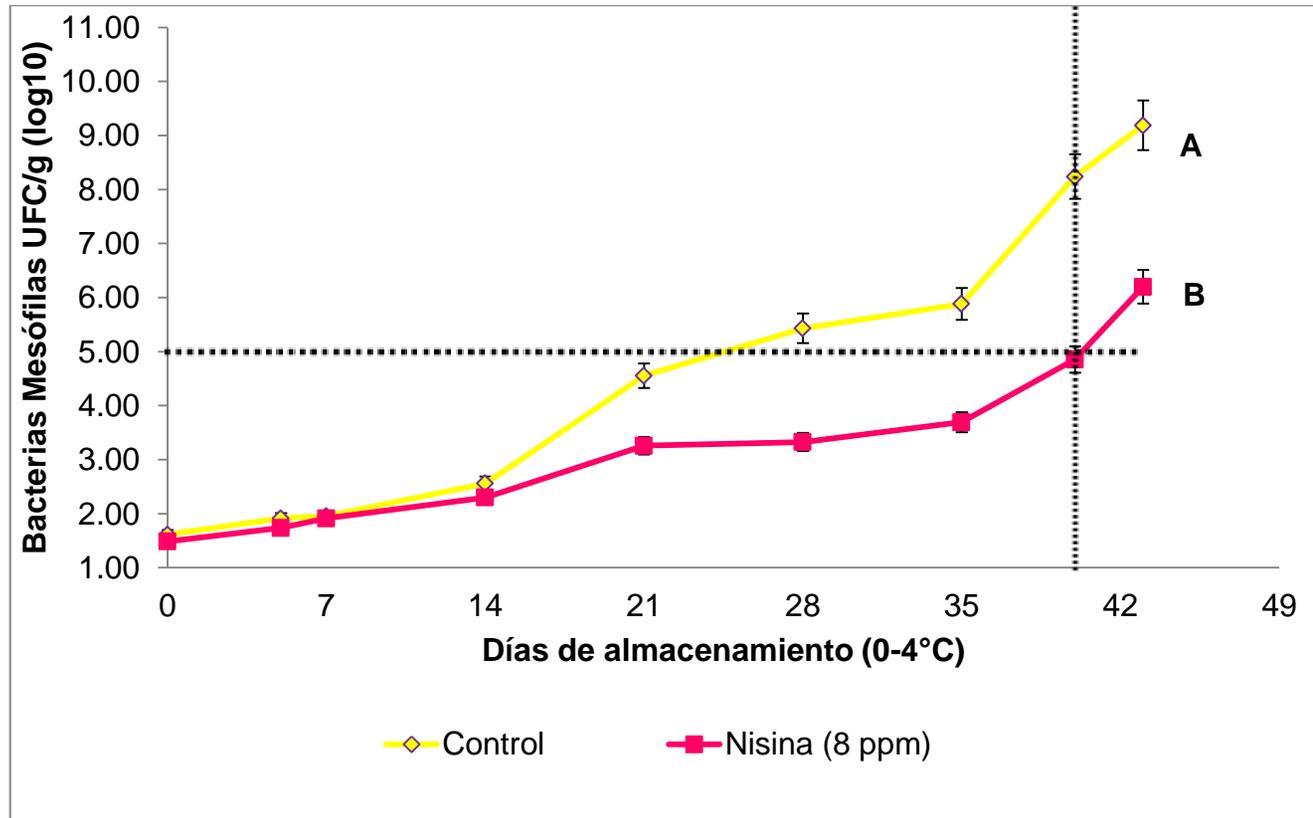
Evaluación Microbiológica de Crecimiento de Mesófilos y Psicrófilos

Los resultados desde el punto de vista microbiológico de salchichas de calamar gigante demuestran un producto muy estable e inocuo durante 42 días de almacenamiento. Las bacterias aerobias mesófilas muestran que el tratamiento (nisina 8 ppm) logró controlar el crecimiento de estas bacterias y las mantuvo dentro de los límites permisibles (5log) establecido por la norma (NOM-129-SSA1-1995) hasta el día 40 de almacenamiento, mostrando mayor ($P < 0.05$) vida de anaquel que el control, teniendo éste último el punto de corte justo antes del día 28 de almacenamiento (Figura 21). Estos resultados corroboran lo observado en la Etapa II, donde el tratamiento con nisina 8 ppm prolongó la vida de anaquel de salchichas de calamar *versus* el control.

Para el caso de las bacterias psicrófilas es importante aclarar que las normativas mexicanas no han establecido los niveles máximos permisibles, sin embargo es de gran importancia el monitoreo de estas bacterias, las cuales en conjunto con los mesófilos son indicadores de deterioro de los alimentos (Pierson y Smoot, 2001). En la Figura 22 se observa el comportamiento de las bacterias psicrófilas sobre las salchichas de calamar durante su almacenamiento. Se observó un comportamiento similar a las bacterias mesófilas mostrando diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos. De igual forma las salchichas tratadas con nisina 8 ppm se mantuvieron dentro de los límites permisibles para bacterias aerobias (5 log) hasta el día 40 de almacenamiento, mientras que para el control su punto de corte fue justo antes del día 28.

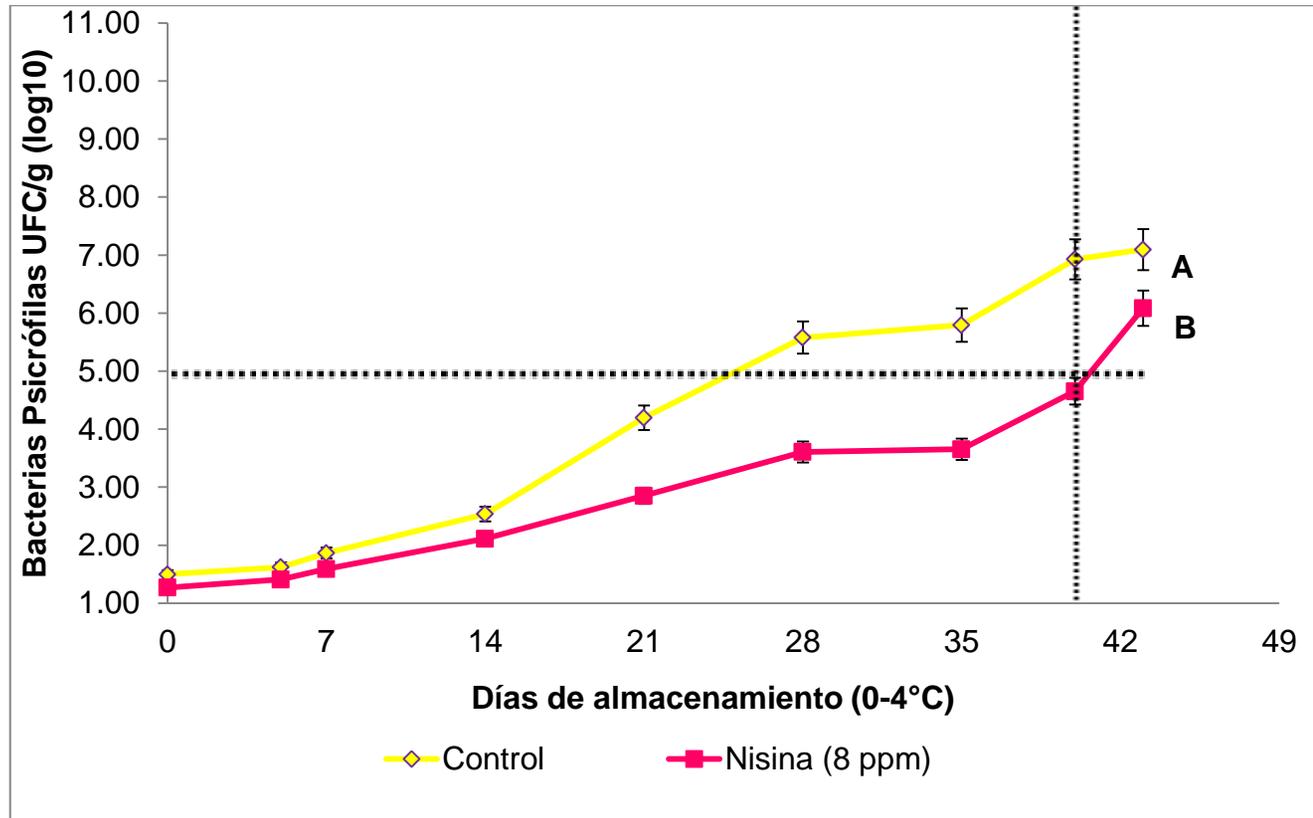
Crecimiento de Bacterias Ácido Lácticas.

Las bacterias lácticas son frecuentemente asociadas con el deterioro de la mayoría de las carnes procesadas por calor, cuya presencia puede generar cambios físicos y sensoriales, como por ejemplo acidez del producto (disminución de pH), producción de gas, producción de película cremosa y drenaje de líquido (De Barros et al., 2010; Borch et al., 1996). En la Figura 23,



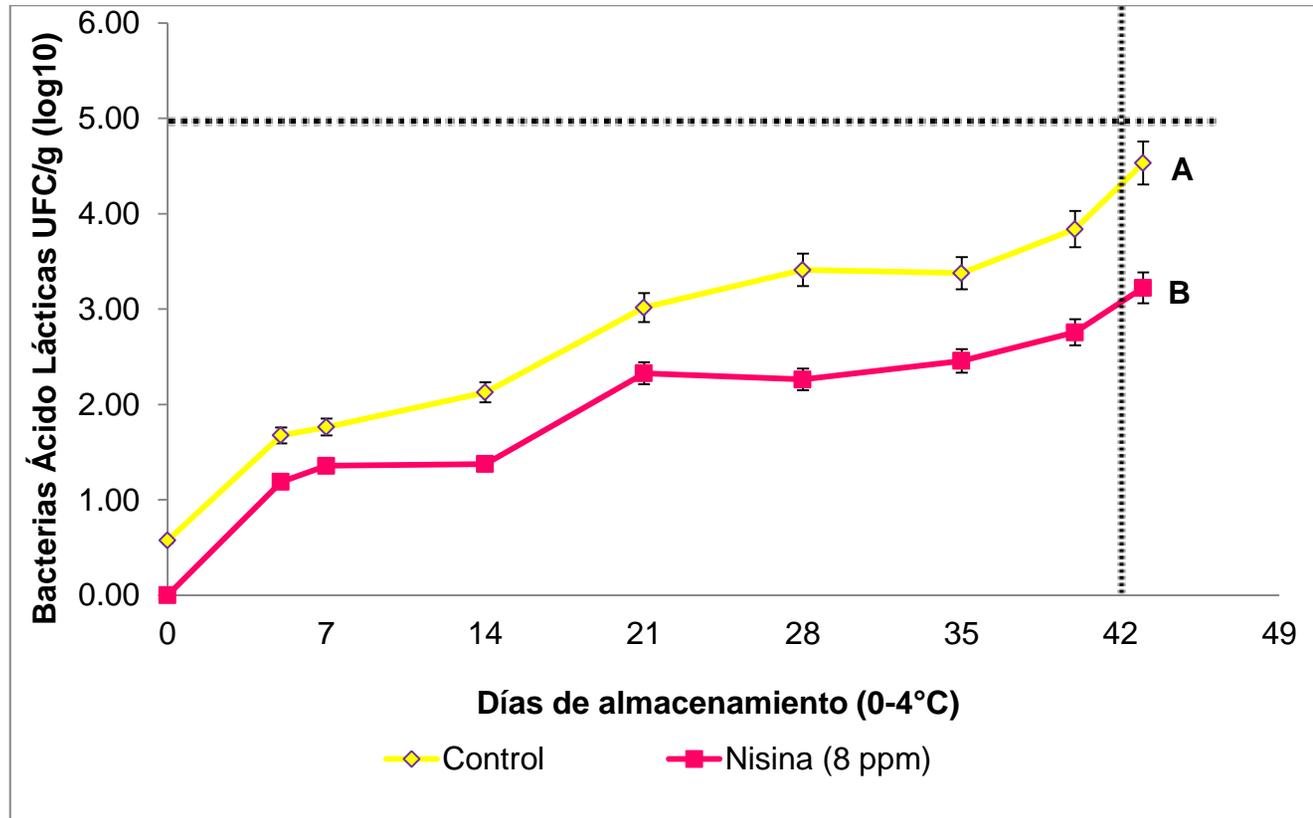
Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 21. Cambios en la población de bacterias mesófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 22. Cambios en la población de bacterias psicrófilas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento.

Figura 23. Cambios en la población de bacterias ácido lácticas (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.

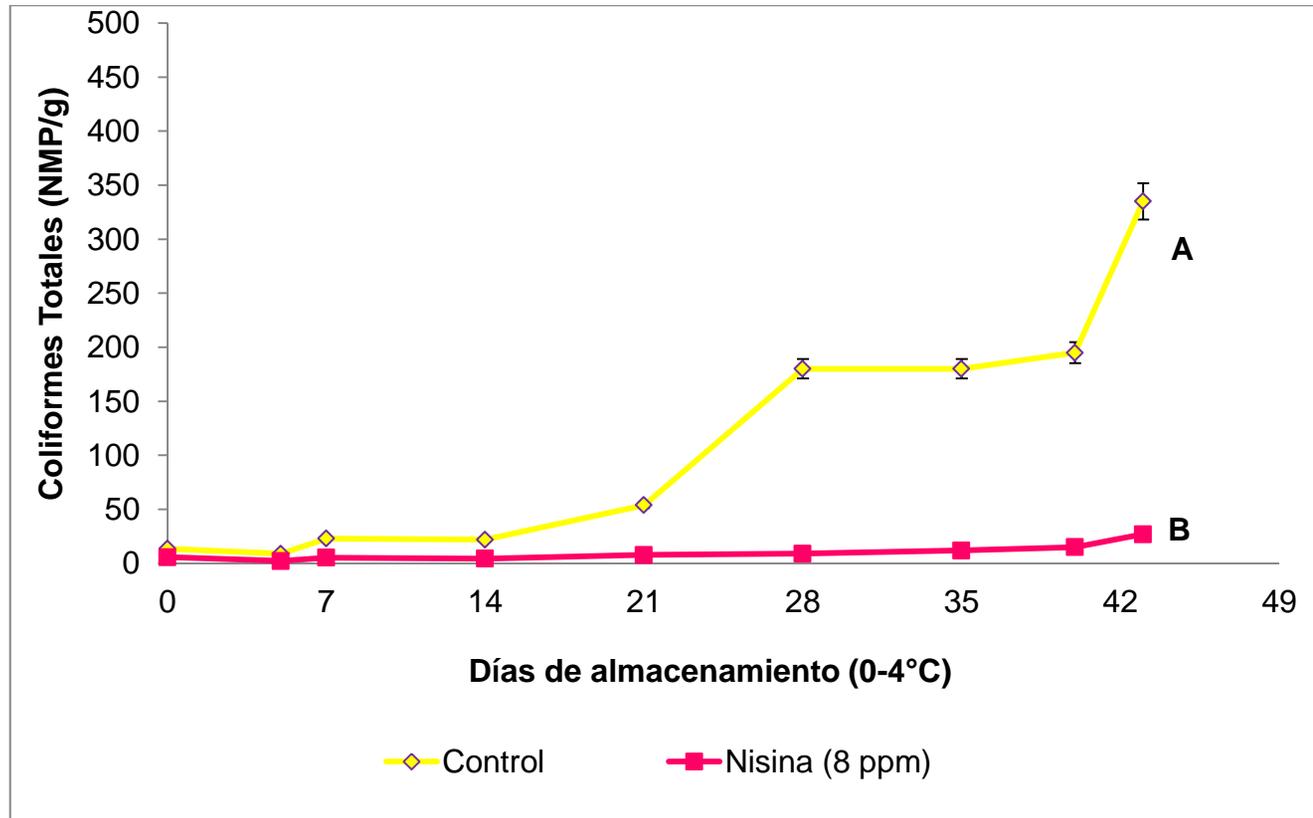
se puede observar que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el tratamiento y el control. La nisina 8 ppm logró controlar este grupo de bacterias durante los 42 días de almacenamiento, mostrándose muy por debajo de lo reportado en estudios previos de salchicha de calamar el cual presentó un tiempo de almacenamiento de 21 días de almacenamiento, (Félix-Armenta et al., 2009). En la evaluación de pH se había observado un descenso marcado de este parámetro por parte del tratamiento control entre los días 14-21 de almacenamiento, mismo que se asocia con el incremento de las bacterias ácido lácticas, y el haber controlado el pH con el tratamiento con nisina, esto sugiere ser un antimicrobiano de elección para este tipo de producto.

Coliformes Totales

Los coliformes, son un grupo de microorganismos de importancia, que nos van a indicar las condiciones sanitarias durante el procesamiento y almacenamiento del producto en cuestión (Pascual y Calderón, 1999). En la Figura 24 se observa que ambos casos se mantuvieron los indicadores de higiene bajo las normas oficiales durante todo el almacenamiento. El tratamiento con nisina fue más efectivo (27 NMP/g), reflejando un producto estable e inocuo durante 42 días de estudio, mientras que el control aunque incrementó el contaje para coliformes, se mantuvo dentro de los límites (< 230 NMP/g) hasta el día 40 de almacenamiento (NOM-129-SSA1-1995). Por otro lado los coliformes fecales (Figura 25) se mantuvieron por debajo del límite permisible, durante todo el almacenamiento y reflejaron valores por debajo de 5 NMP/g. Estos resultados nos muestran las buenas prácticas de producción e higiene durante el procesamiento y almacenamiento de las salchichas de calamar.

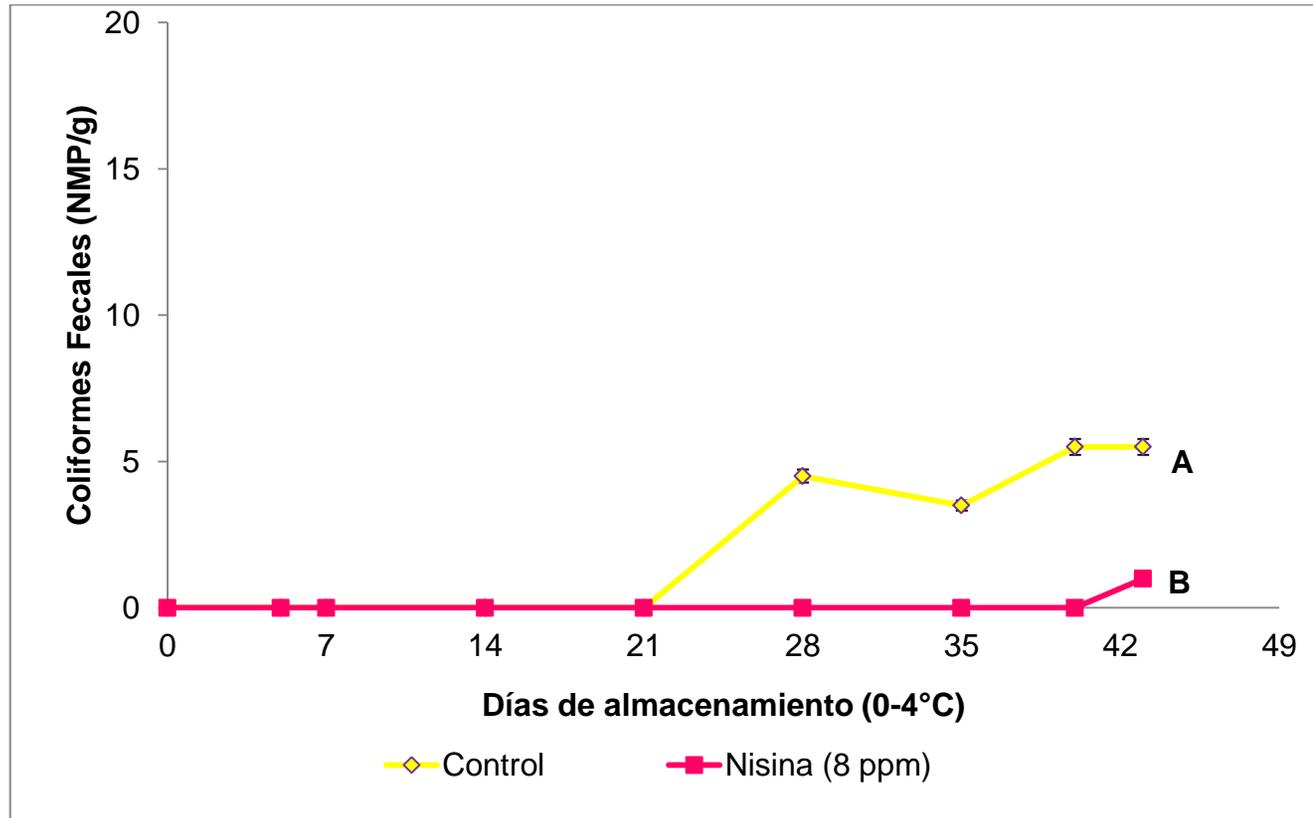
Microorganismos Patógenos

Los productos procesados listos para el consumo deben estar exentos de microorganismos patógenos. En la Tabla 19, muestra que los microorganismos



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 24. Cambios en la población de Coliformes Totales (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.



Diferente literal indican diferencias ($P < 0.05$) por efecto del tratamiento

Figura 25. Cambios en la población de coliformes fecales (media de log de UFC/g) en salchichas de calamar durante su almacenamiento en refrigeración.

Tabla 19. Microorganismos patógenos en formulaciones de salchicha de calamar.

Microorganismo patógeno	Muestras	
	Control	Tratamiento
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente
<i>Salmonella ssp</i>	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente	Ausente

patógenos evaluados para la salchicha de calamar, resultaron negativos (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*).

Análisis Sensorial

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la prueba de diferencias del tratamiento (nisina 8 ppm) contra el control, esta prueba se aplicó para los primeros 21 días de almacenamiento en refrigeración de las salchichas de calamar. En los muestreos correspondientes al día 28-40 se modificó la prueba a una análisis de aceptación, calificando los mismos parámetros contemplados anteriormente (color, olor, sabor, apariencia y textura) y evaluado por el mismo panel (grupo de 8 persona entrenadas), esto debido a que según los datos microbiológicos cortaron la vida de anaquel del control, una vez que este superó los límites permitidos (día 28). La finalidad del cambio de prueba sensorial, fue para saber el nivel de aceptación del tratamiento (salchicha con antimicrobiano), si bien microbiológicamente seguían dentro de los límites permisibles era importante saber qué porcentaje de aceptación conservaba.

Para la prueba de diferencias, se consideraron valores de 0-1.75= sin cambio, de 1.75-3.5= con cambios de intensidad y valores mayores a 3.5= fuera del rango normal (deterioro). Los parámetros evaluados (color, olor, sabor, apariencia y textura) hasta el día 21 de almacenamiento cayeron en el rango de 0-1.75 (sin cambio) (Figura 26). Sin embargo, se lograron observar diferencias ($P < 0.05$) de los parámetros de olor, color y apariencia total, siendo el día 21 el que marco la diferencia de control vs tratamiento con nisina. Como comentarios de los panelistas se observó un aumento en el olor por parte del control intensificando el olor a calamar y disminuyendo el olor a humo.

Para la prueba de aceptación y rechazo en la Figura 27, en líneas generales se puede observar un porcentaje de aceptación fue alto (80-100%)

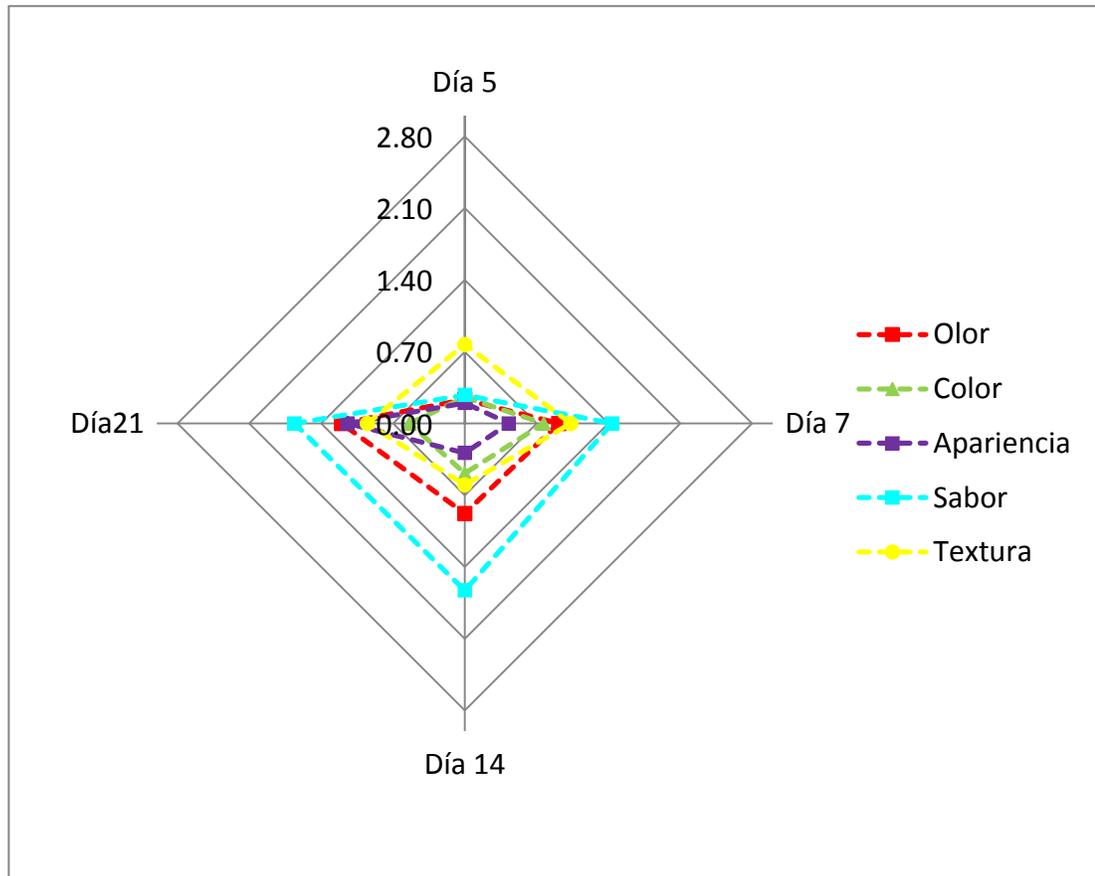


Figura 26. Evaluación sensorial de diferencias contra el control en salchichas de calamar durante el almacenamiento en refrigeración (2-4°C) durante 21 días.

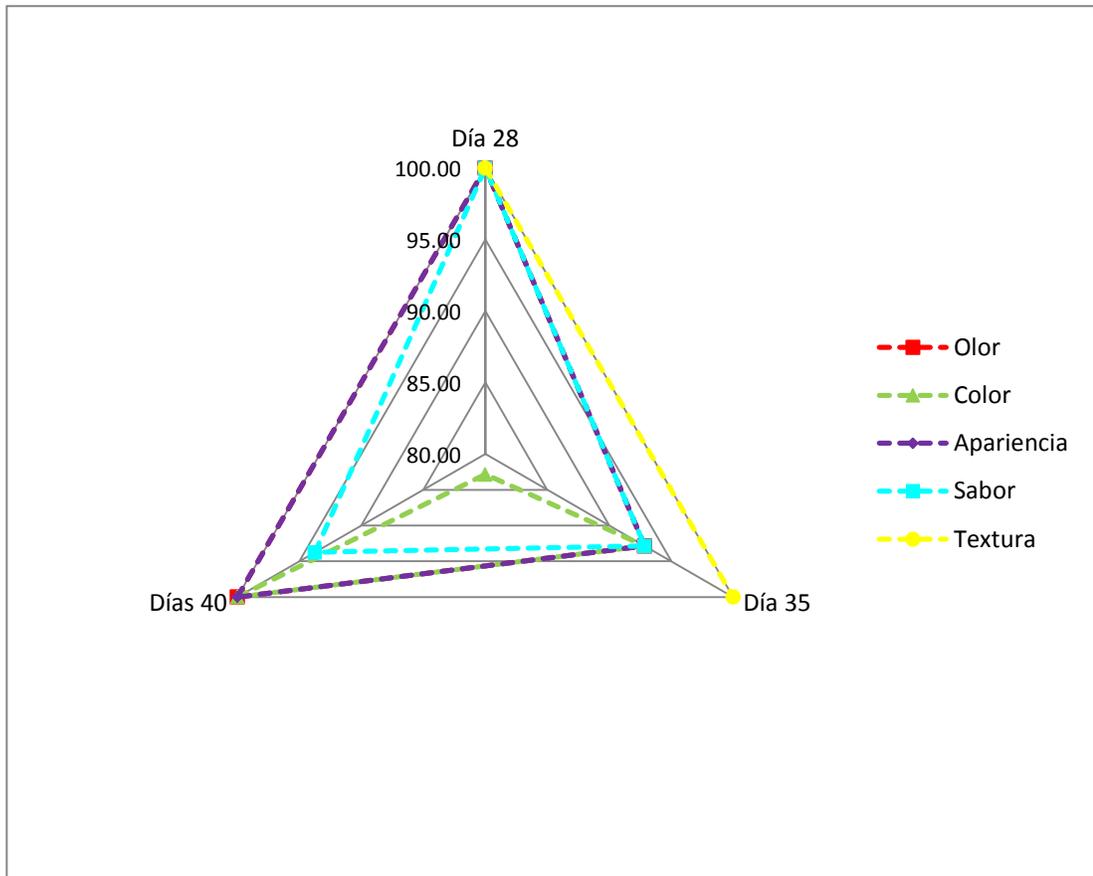


Figura 27. Evaluación sensorial de aceptación y rechazo en salchichas de calamar con nisina 8 ppm durante el almacenamiento en refrigeración (2-4°C) del día 28 al 40.

por parte de los panelistas en todos los parámetros evaluados. Sin embargo el color fue el que se mostró más afectado (78.52-100%). Los comentarios adicionales de los panelistas en esta prueba tendieron a señalar un aumento en la dureza de la textura de la salchicha, así como en la intensidad del olor a calamar.

Con ambas pruebas sensoriales se puede concluir que el control tuvo aceptabilidad por parte de los panelistas durante su evaluación (21 días), así también se puede resaltar que las salchichas de calamar con antimicrobiano tuvieron excelente aceptabilidad sensorial durante una vida de anaquel de 40 días.

Conclusiones Etapa III

- Desde el punto de vista fisicoquímico las salchichas de calamar tratadas con nisina se mantuvieron estables durante el almacenamiento. El pH y a_w fueron los parámetros fisicoquímico determinante en el tiempo de corte para tratamiento control.
- Microbiológicamente las salchichas de calamar con antimicrobiano natural se mantuvieron estables durante 40 días de almacenamiento, siendo las bacterias mesófilas las que dictaron el punto de corte. No se observaron presencia de microorganismos patógenos durante los 42 días de almacenamiento.
- Sensorialmente las salchichas de calamar con antimicrobiano tuvieron una alta aceptación durante los 40 días de almacenamiento, considerándolo un producto de calidad, de gran aceptabilidad y competencia para su comercialización.

CONCLUSIÓN GENERAL

La incorporación de nisina en concentraciones de 8 ppm logró prolongar hasta 40 días las características de calidad durante la vida de anaquel en refrigeración de un producto gel-emulsificado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) optimizado con soya y almidón.

BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L.; Guarda, A.; Perez, L. M. y Donghi, M. I. (2000). Caracterización funcional y bioquímica de la carne del manto de jibia (*Dosidicus gigas*). ALAN. 5(4): 380-386.
- A.O.A.C. Official Methods (2000). VII, 950.46, 938.02, 920.39
- Aymerich, T.; Picouet, P:A. y Monfort, J:M. (2008). Decontamination technologies for meat products. Meat Science. 78: 114-129.
- Bacteriological Analytical Manual (BAM). (1998). Revision A, Chapter 3,4,9 y 10. 8 edición.
- Badui, D.S. (1999). Química de los alimentos. Addison Wesley Longman.
- Badui, D.S. (2006). Química de los alimentos. Addison Wesley Longman.
- Bazzino, G.; Gilly, W.F.; Markaida, U.; Salinas-Zavala, C.A. y Ramos-Castillejo, J. (2010). Horizontal movements, vertical hábitat utilization and diet of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Pacific Ocean off Baja California Sur, Mexico. Prog. Oceanogr. 86:59-71.
- Beggs, K.L.H., Bowers, J.A., Brown, D. (1997). Sensory and physical characteristics of reduced-fat turkey frankfurters with modified corn starch and water. J. Food. Sci. 62(6):1240.
- Borch, E., Kant-Muermas, M.L. y Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. International Journal of Food Microbiology. 33: 103-120.
- Ben-Hammou, F.; Skali, S.N.; Idaomar, M. y Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. African Journal of Biotechnology. 9 (8):1190-1195.

- Borderías, A. J. y Montero, P. (1988). Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 28(2):159-169.
- Bourne, A.J. (2002). *Food texture and viscosity: Concept and measurement* Geneva, New York, U.S.A. Ed Academic press. pp. 183-185.
- Brotz, H.; Bierbaum, G.; Leopold, K.; Reinolds, P.E. y Sahl, H.G. (1998). The lanthibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis by targeting lipid II. *Antimicrobiology Agents Chemother.* 42:154-160.
- Burt, S. (2004). Essentials oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223–253.
- Cardoso, C.; Mendes, R. y Nunes, M.L. (2008). Development of a healthy low-fat fish sausage containing dietary fibre. *International Journal of Food Science and Technology.* 43: 276-283.
- Chang, H.C. y Carpenter, J.A. (1997). Optimizing quality of frankfurters containing oat bran and added water. *J. Food Sci.* 62:194-197.
- Cheng, C. S., Hamann, D. D., Webb, N. B (1979). Effects of species and storage time on minced fish gel texture. *J. Food. Sci.* 44 (4) :1087.
- Chen, H., y Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2: 81–100.
- CONAPESCA (2010). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2009* Dirección general de planeación, programación y evaluación. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- CONAPESCA (2012). *Seguimiento mensual de la producción de calamar Enero-Agosto 2012.* Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.
- Cortés-Ruiz, J.A.; Pacheco-Aguilar, R.; Lugo-Sánchez, M.E.; Carvallo-Ruiz, M.G. y García-Sánchez, 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.
- Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M. y Tawata, S. (2007). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control.* 19: 346–352.

- De Barros, J., Kuning, L. y Jurkiewicz, C. (2010). Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 1001-1008.
- De la Cruz-González, F.; Aragón-Noriega, A.; Urciaga-García, J. I.; Salinas-Zavala, C.; Cisneros-Mata, M. A. y Beltrán-Morales, L. F. (2007). Análisis socioeconómico de las pesquerías de camarón y calamar gigante en el noroeste de México. *Interciencia*. 32(3): 144-150.
- De la Fuente-Salcido, M. y Barboza-Corona, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*. 20(1): 43-52.
- De la Fuente-Betancourt, G.; García-Carreño, F.; Navarrete-Del Toro, M.A.; Córdova-Murueta, J.H. y Lugo-Sánchez, M.A. (2009). Protein Solubility And Production Of Gels From Jumbo Squid. *Journal of Food Biochemistry*. **33**: 273–290.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*. 44:100-117
- Delves-Broughton, J.; Blackburn, P.; Evans, R.J. y Hugenholtz J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69(2): 193-202.
- Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*. 57: 525-527.
- Dergal, S. (1993). *Química de los Alimentos*. Addison Wesley Longman.
- Dincer, T. y Cakli, S. (2010). Textural and Sensory Properties of Fish Sausage from Rainbow Trout. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 19:238-248.
- Dexter, D.R.; Sofos, J.N. y Schmidt, G.R. 1993. Quality characteristics of turkey bologna formulated with carrageenan, starch, milk and soy protein. *J. Muscle Foods* 4, 207-223.
- Elotmani, F. y Assobhei, O. (2004). In vitro inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 60-65.

- Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K. y Ishizaki., A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews. 24: 85-106.
- Estévez, M.; Ventanas, S. y Cava, R. (2006). Protein Oxidation in Frankfurters with Increasing Levels of Added Rosemary Essential Oil: Effect on Color and Texture Deterioration. Journal Of Food Science. 70(7):427-432.
- Ezquerro-Brauer, J. M.; Haard, N.; Ramírez-Olivas, R.; Olivas-Burrola, Hermenegildo y Velásquez-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: 459-475.
- FAO. (2009). Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Departamento de Pesca y Acuicultura.
- Félix-Armenta, A.; Ramírez-Suárez, J.C.; Pacheco-Aguilar, R.; Díaz-Cinco, M. E.; Cumplido-Barbeitia, G. y Carvallo-Ruiz, G. (2009). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle gelled-emulsified type product: formulation, processing and physicochemical characteristics. International Journal of Food Science and Technology. 44:1517-1524.
- FIS, 2010. FIS Member SAGARPA.Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology, 101(6):1232-1240.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. Food Science & Technology. 19:156-164.
- Flores, J. y Bermell, s. (1984). Propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares: capacidad de retención de agua. Rev. Agroquimi. Technol. Aliment., 24 (2), 151-158.

- García, A.; Izquierdo, P.; Uzcátegui-Bracho, S.; Farías, J.F. y García, A.C. (2005). Formulación de salchicha con atún y carne. *Revista científica*. 15(3):272-278.
- Helander, I. M.; Alakomi, H.L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J. ; Gorris, L.G.M. y Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (9): 3590–3595.
- Huda, N.; Alistair, T.L.; Lim, H.W. y Nopianti, R. (2012). Some Quality Characteristics of Malaysian Commercial Fish Sausage. *Pakistan Journal of Nutrition*. 11 (8): 700-705.
- Huff-Lonergan, E. y Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of Water-Holding Capacity of Meat: The Role of Postmortem Biochemical and Structural Changes. *Meat Sci*. 71:194-204.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the biopreservation meat and meat products. *Meat Science*. 40 (1): 150-139.
- Hultin, H.; Feng, Y. y Stanley, D. (1995). A Re-examination of Muscle Protein Solubility. *Journal of Muscle Foods*. 6(2):91-107.
- Hurst, A. 1981. "Nisin". Academic Press, New York En *Advances in Applied Microbiology*. 27(85): 85-123.
- Izquierdo, P.; García, A.; Allara, M.; Rojas, E.; Torres, G. y González, P. (2007). Proximate Analysis, Microbiological and Sensorial Evaluation of Sausages Elaborated with Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). *Revista científica*. 17(3):294-300.
- Jimenez-Colmero, F., Cofrades, S., López- López, I., Ruiz-Capillas, C., Pintado, T. y Solas, M.T. (2010). Technology and sensory characteristics of reduce/low-fat, low-salt frankfurters as effected by the addition of konjac and seaweed. *Meat Science*, 84:356-363.
- Kabuki, T.; Nakajima, H.; Arai, M.; Ueda, S.; Kuwabara, Y. y Dosako, S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chem*. 71: 61-66.

- Kim, J. M.; Marshall, M. R.; Cornell, J. A.; Preston, J. F. y Wei, C. I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*. 60:1364-1374.
- Kijowski, J. (2001). Muscle proteins. Chemical and functional properties of Food proteins. Z.E. Zikorski. Pennsylvania, USA, Technomic Publishing Company. 233-229.
- Klett, A. (1996). Pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas*. En estudio del potencial pesquero y acuícola de baja California Sur. Volumen I, compilado por Margarita Casas y German Ponce. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California Sur. 127-149.
- Koniecko, E. (1979). Handbook for meat chemists. Avery Pub. Co. New Jersey, USA. 94.
- Kudo, G.; Okada, M. y Miyaguchi, D. (1973). Gel-forming capacity of washed and unwashed flesh from some pacific coast species of fish. *Marine Fisheries Review*. 35(12): 10-15.
- Lanier, T., P. Carvajal, y J. Yongsawatdigul. (2000) Surimi gelation chemistry. Surimi and surimi seafood. 237–265.
- Lecomte, N.B. y Zayas, J.F. (1993). Properties of batters and storage stability of frankfurters containing preemulsified fat stabilized with soy proteins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 287– 304.
- Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Academic Dissertation. Department of Food and Environmental Hygiene. Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki.
- Luna-Raya, C.; Urciaga-García, J. I.; Salinas-Zavala, C.; Cisneros-Mata, M. A. y Beltrán-Morales, L. F. (2006). Diagnostico del consumo de calamar gigante en México y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*. (22): 535-560.
- Mahmoud, B. S. M.; Yamazaki, K.; Miyashita, K.; Il-Shik, S.; Dong-Suk, C. y Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its

- shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*. 21(6): 657-666.
- Markaida, U. (2001). Reproductive Biology of Jumbo Squid, *Dosidicus gigas* (*Cephalopoda: Ommastrephidae*) in the Gulf of California. 1995-1997. *Fishery Research*. 54(1):63-82.
- Markaida, U. y Sosa-Nishizaki, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (*Cephalopoda: Ommastrephidae*) from de Gulf of California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 83:507-522.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V. y Carr, B.T. (1987). *Sensory Evalaution Techniques*. CRC Press, INC. 2da. Edición. Boca Raton, Florida. pp 67-77.
- McLelland, M.R.; Lind, L.R. y Kime, R.W. (1995). Hue angle determinations and statical analysis for multiquadrant Hunter L*, a*, b* data. *Journal of quality*. 18: 235-240.
- Minolta Corp. (1990). *Precise Color Communication*. Osaka, Japan: Minolta Co. Ltd.
- Mohammadi, M. y Oghabi, F. (2011). Development of low-fat and low-calorie beef sausage using modified starch as fat replacement agent. *J Sci Food Agric*. 92: 1291–1296.
- Montgomery, D. C. (2003). *Diseño y análisis de experimentos*. México. Limusa-Wiley.
- Mossel, B.; Moreno, C. y Struijk, B. (2003). *Microbiología de los Alimentos 2*. Zaragoza, España. 703.
- Nigmatullin, C. M., Nesis, K. N. y Arkhipkin, A. I. (2001). Biology of the Jumbo Squid *Dosidicus gigas*. *Fish. Res.* 54: 9-19.
- Nilsson, N. Y.; Christiansen, J.N.; Jorgensen, B.L.; Grotinum, D. y Gram L (2004). The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 133-143.

- NMX-F-065-1984. Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Foods. Sausage. Specifications. Normas Mexicanas. Dirección General De Normas.
- NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- NOM-122-SSA1-194. Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, curados y emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.
- NOM-129-SSA1-1995. Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasteropodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológica para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
- O'Bryan, C.; Crandall, P.; Chalova, V. y Ricke, S. (2008). Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*. 73:264–267.
- Pascuala, M.R. y Calderón, V. (199). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. España. 464
- Pedrero, D.L. y Pamgbor, R.M. (1989). *Evaluación Sensorial de los Alimentos. Métodos Analíticos*. Mexico: Editorial Alambra de C.V.
- Pérez-Mateos, M.; Montero, P. y Gómez-Guillen, M. A. (2002). Addition of microbial transglutaminase and protease inhibitors to improve gel properties of frozen squid muscle. *European Food Research and Technology*. 214: 377-381.

- Pierson, M. y Smoot L. (2001) Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2 ed. USA. 71-87.
- Ponce, A.E., G.O. Dublán, y Z.Z. Vázquez. (2009) Calamar. En tecnología de productos de origen acuático. LIMUSA: México D. F. 331-360.
- PROFECO (2005). Salchichas. Revista del Consumidor. Procuraduría Federal del Consumidor. Enero. 44-55.
- PROFECO (2010). El rey: Salchichas para Hot dog. Revista del consumidor. Procuraduría Federal del Consumidor. Septiembre. 34-45.
- Ramirez-Suarez, J.C.; Ibarra-León, R.L.; Pacheco-Aguilar, R.; Lugo-Sánchez, M.E.; García-Sánchez, G. y Carvallo-Ruiz, Gisela. (2008). Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. Food Chemistry. 111: 586–591.
- Rahman, M.S.; Al-Waili, H.; Guizani, N. y Kasapis, S. (2007). Instrumental-sensory evaluation of texture for fish sausage and its storage stability. Fish. Sci. 73:1166-1176.
- Raju, C.V.; Shamasundar, B.A. y Udupa, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2 °C) and refrigerated (6 ± 2 °C) temperatures. International Journal of Food Science and Technology. 38: 171–185.
- Rasooli, I.; Rezaei, M. B.; y Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. International Journal of Infectious Diseases. 10(3): 236-241.
- Ribeiro, B.; Cardoso, C.; Silva, S.A.; Serrano, C.; Ramos, C.; Santos, P.C. y Mendes, R. (2012). Effect of grape dietary fibre on the storage stability of innovative functional seafood products made from farmed meager (*Argyrosomus regius*). International Journal of Food Science and Technology. 1-11.
- Rivera-Parra, I. 2001. La pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) en el golfo de California. Tesis Doctoral. Universidad de Colima.

- Robinson, C.J.; Gómez-Gutiérrez, J. y Salas-de León, D.A. (2013). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) landings in the Gulf of California related to remotely sensed SST and concentrations of chlorophyll a (1998–2012). *Fisheries Research*. 137: 97-103.
- Sánchez-Brambila, G., Álvarez, G., Soto, F., Lyon, B. G. y Pacheco, R. (2004). Identification and Characterization of the off-flavor in mantle muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California. *J. Aq. Food Prod. Technol.* 13(1):55-67.
- Sehgal, H.S.; Shahi, M.; Sehgal, G.K. y Thind, S.S. (2008). Some quality aspects of fish patties prepared from Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59: 192-201.
- Sikorski, Z.E. y Kolodziejska, I. 1986. The composition and properties of squid meat. *Food Chem.* 20: 213–224.
- Singh, P.; Kumar, R.; Sabapathy, S.N. y Bawa, A.S. (2008). Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*. 7:14-28.
- Sureshkumar S. . Kalaikannan A. . Dushyanthan K. y Venkataramanujam V.(2010). Effect of nisin and butylated hydroxy anisole on storage stability of buffalo meat sausage. *J Food Sci Technol.* 47(3):358–363.
- Tassou, C.; Koutsoumanis, K. y Nychas, G. J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*. 33: 273-280.
- Thomas, R.; Anjaneyulu, A.S.; Mendiratta, S.K. y Kondaiah, N. (2008). Effect of humectants on the quality of pork sausages. *Am. J. Food Technol.* 2: 56-67.
- Vallejo-Cordoba, B.; Nakai, S.; Powrie, W.D. y Beveridge, T. (1987). Extended shelf life of frankfurters and fish frankfurter-analogs with added soy protein hydrolysates. *Journal of Food Science*. 52:1133– 1136.
- Viuda-Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J. y Perez-Álvarez, J. (2008). Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus*

- reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) y orange (*Citrus Ssnensis* L.) essential oils. *Journal of Food Safety*. 28:567–576.
- Velázquez-Abunader, J. I.; Nevárez-Martínez, M. O. y Hernández-Herrera, A. (2010). Distribución de Tallas y Condición Reproductiva del Calamar Gigante *Dosidicus Gigas* (D´Orbigny, 1835) en el Golfo de California. *CICIMAR Oceánides*. 25(2): 103-110.
- Verrez-Bagnis, V.; Bouchet, B. y Gallant, D.J. (1993). Relationship between the starch granule structure and the textural properties of heat-induced surimi gel. *Food Structure*. 12: 309-320.
- Vojdani, F. (1996). Solubility En: *Methods of Testing Protein Functionality*. Edited by G. M. Hall. 11-60.
- Yang, A.; Trout, G.R. y Shay, B.J. (1995). Evaluation of carrageenan, isolated soy protein and a modified starch in low fat frankfurters. August 20-25, 41st Annual International Congress of Meat Science & Technology, 2:435-436.
- Yang, H.S.; Choi, S.G.; Jeon, J.T.; Park, G.B. y Joo, S.T. (2006). Textural and sensory properties of low fat pork sausages with added hydrated oatmeal and tofu as texture-modifying agents. *Meat Sci*. 75: 283-289.
- Woyewoda, A.D.; Shaw, S.J. y Burns, B.G. (1986). Recommended Laboratory Method fo Assement of Fish Quality. Canadian Technical Report of Fishery and Aquatic Sciences No. 1448.

ANEXO 1

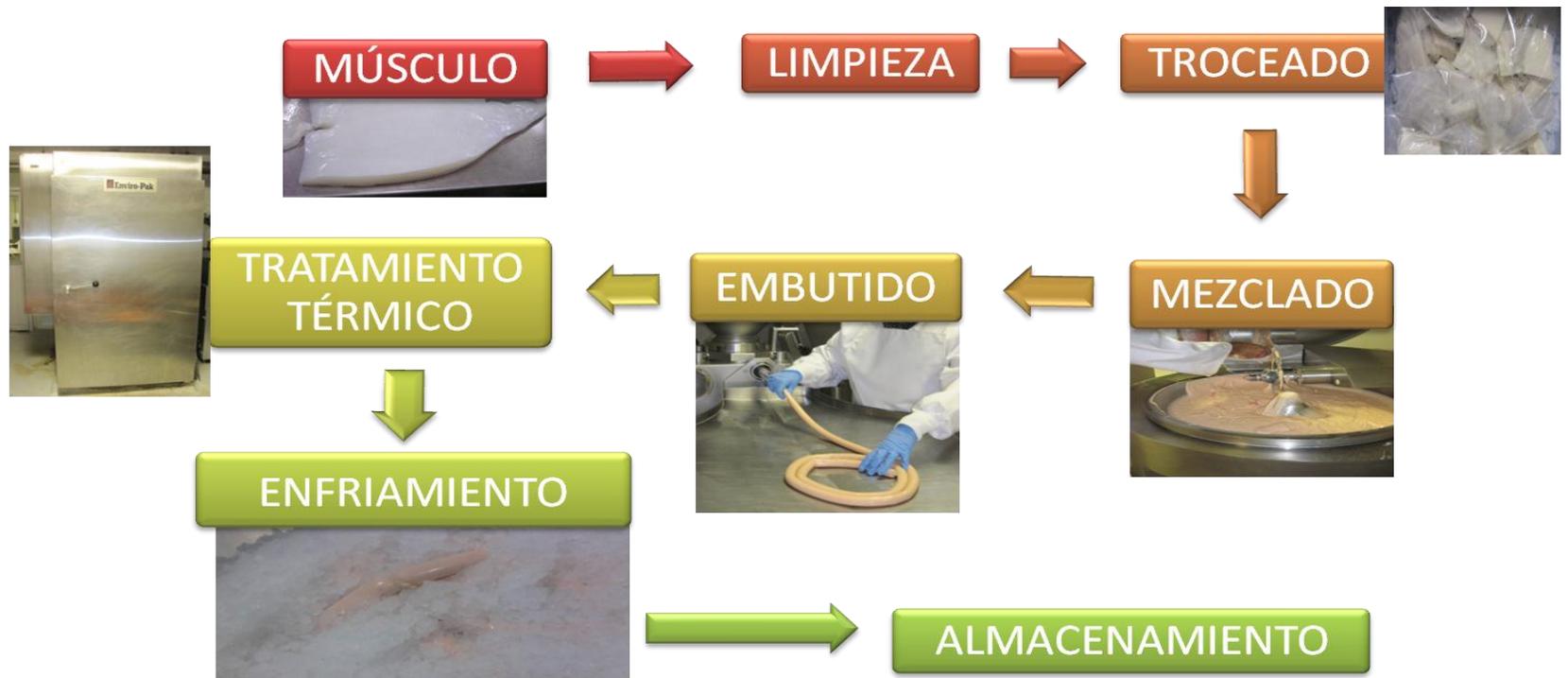


Figura 28. Proceso de elaboración de salchicha de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).



Molienda de músculo de calamar



Adición de ingredientes



Adición de humo líquido



Adición de colorante



Pasta de salchicha de calamar



Embutido de salchicha de calamar



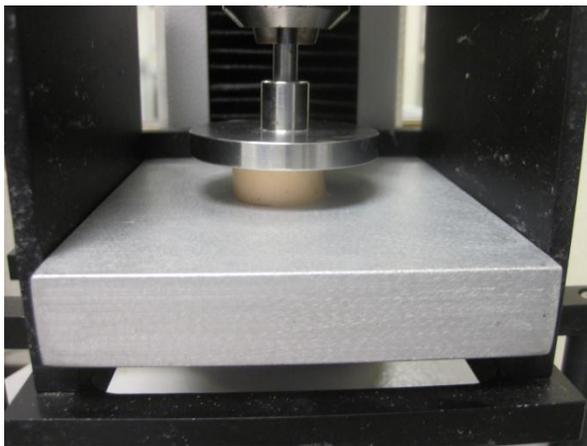
Amarre de salchichas de calamar



Salchichas de calamar



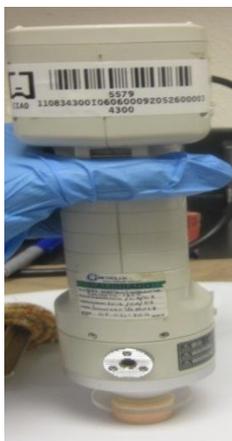
Análisis microbiológicos



Análisis de perfil de textura



Prueba de doblado



Análisis de color

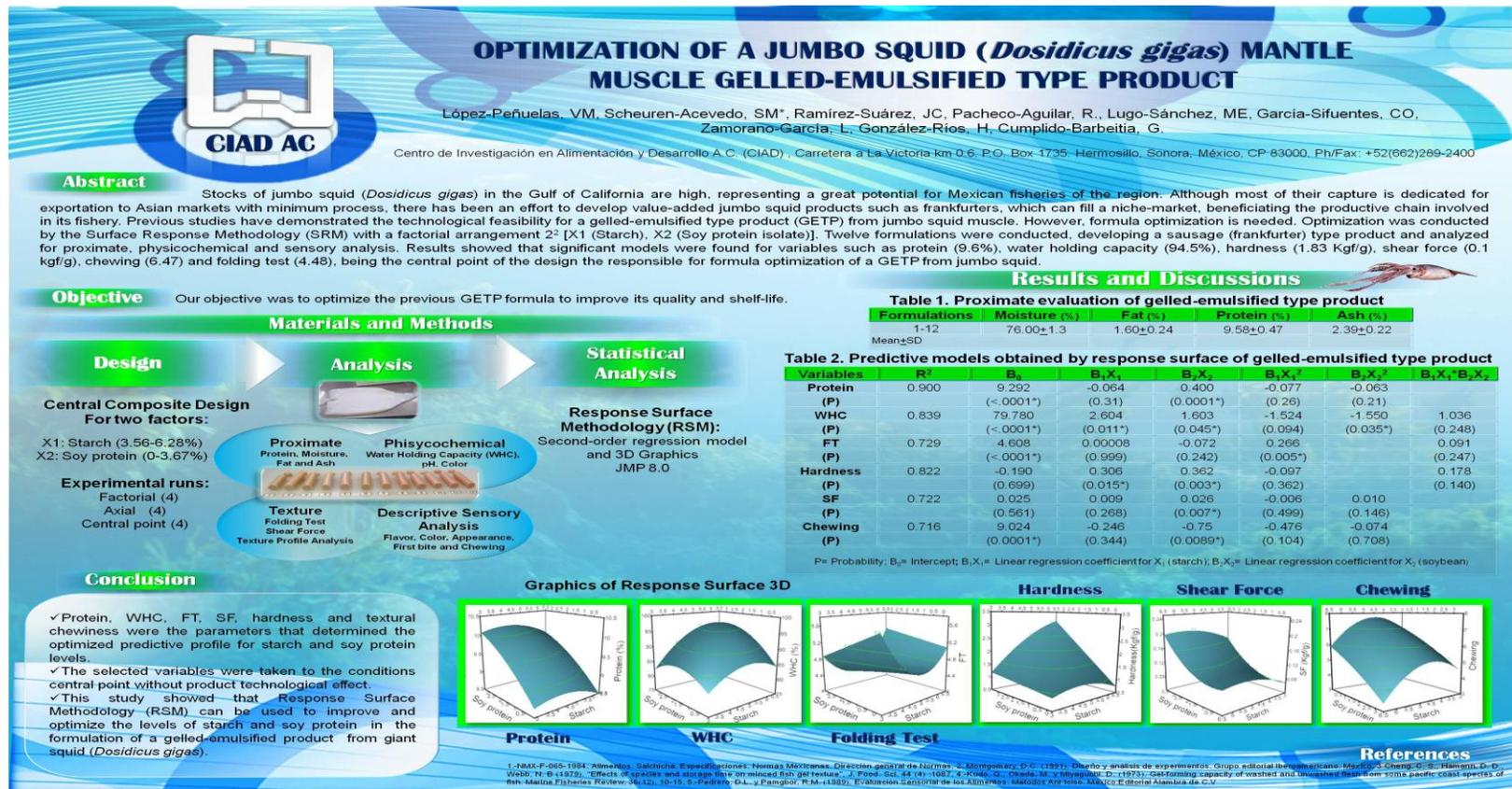


Determinación de actividad de agua



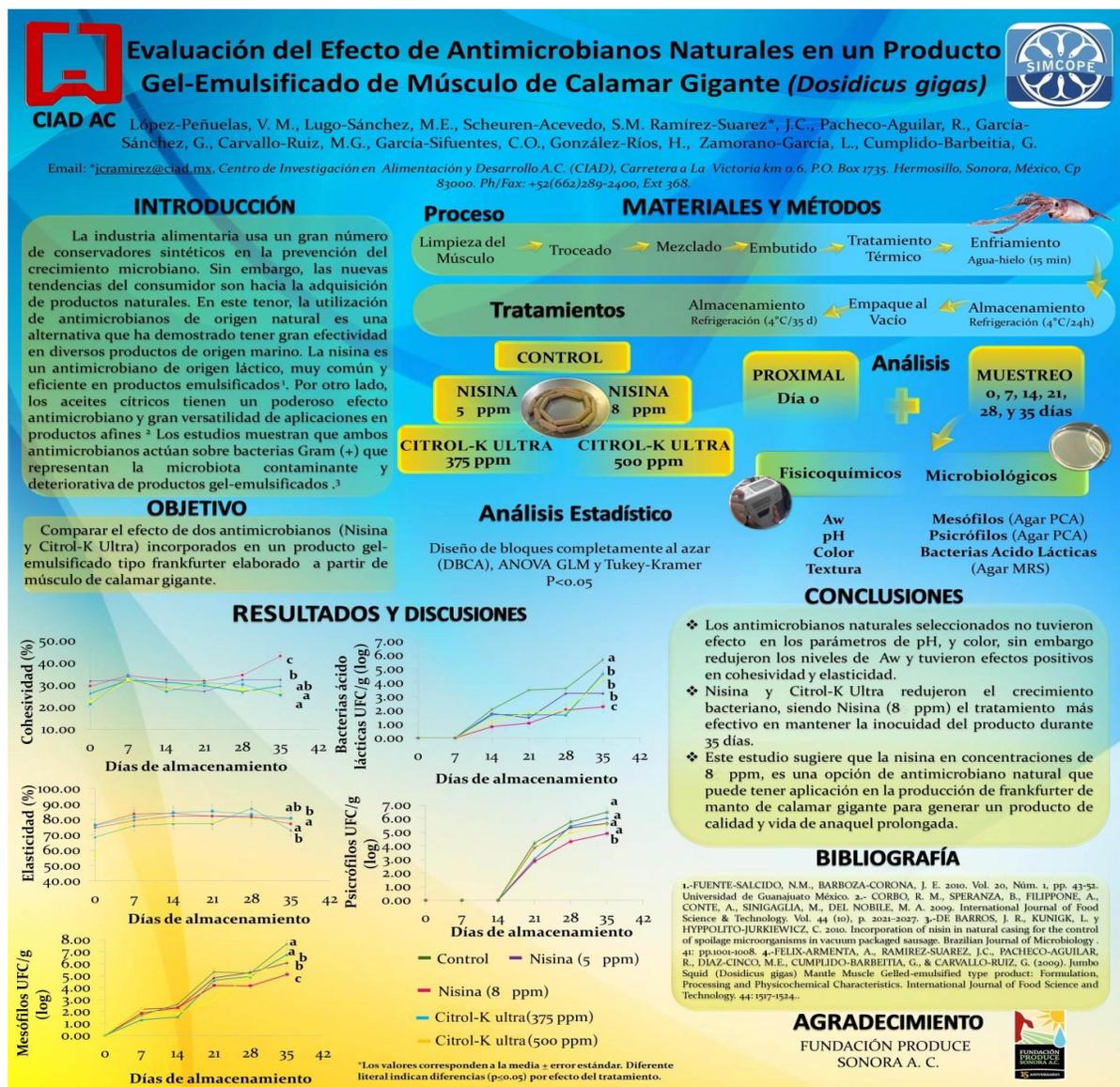
ANEXO 2

La primera Etapa de este trabajo fue presentado en el Congreso Internacional de Tecnólogos de Alimentos (Institute of Food Technologist (IFT, por sus siglas en Ingles) Annual Meeting), realizado del 25 al 28 de Junio del 2012 en Las Vegas, Nevada, Estados Unidos. Se anexa el POSTER/CARTEL presentado.



ANEXO 3

La segunda Etapa de este Trabajo fue presentada en el V Congreso SIMCOPE (Simposio de Control de Calidad de Pescado. Por sus siglas en portugués), del 19 al 21 de Junio del 2012, en Santos, Sao Paulo, Brasil. Se anexa en POSTER/CARTEL presentado. El programa del evento puede ser consultado en el siguiente link y el código del trabajo es 081. http://www.simcope.com.br/resumos_aceitos.html.



ANEXO 4

El producto salchicha (frankfurter) de calamar gigante fue presentado al público en una degustación durante el “FESTIVAL POPULAR DE LA CIENCIA”: Tejiendo lazos con la sociedad”. Este evento tuvo lugar el 10 de Marzo del 2012, en la explanada de la Plaza Bicentenario en Hermosillo, Sonora, organizada para el XXX aniversario del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.



ANEXO 5

Formato Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa I

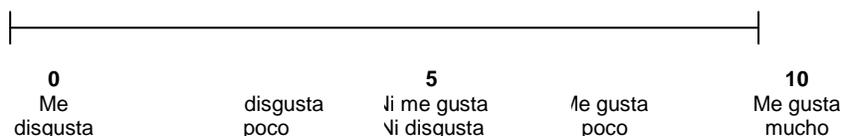
ANALISIS SENSORIAL DE SALCHICHAS DE CALAMAR

Nombre: _____

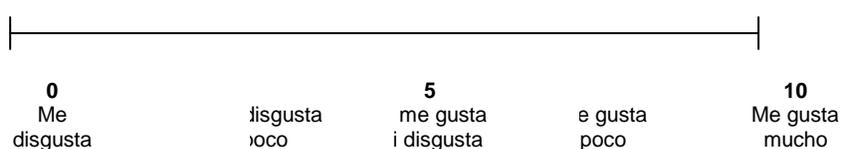
Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Marque con una X la escala que le asigne en cada una de las muestras de acuerdo a la intensidad de percepción. Pruebe galleta y consuma agua antes de probar cada una de ellas.

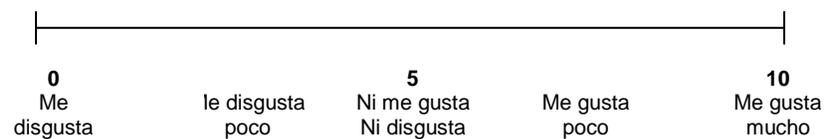
COLOR



APARIENCIA TOTAL



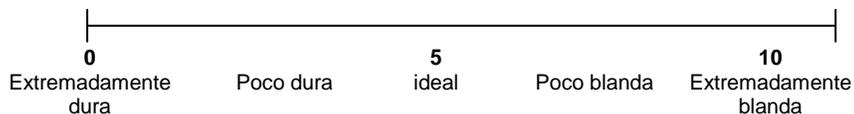
SABOR



TEXTURA AL MORDER



TEXTURA AL MASTICAR



Observaciones y/o Comentarios

Gracias Por Su Participación

Formato (a) Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa III

ANALISIS SENSORIAL DE SALCHICHA DE CALAMAR-VA

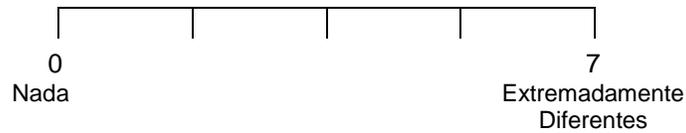
Nombre: _____

Fecha: _____

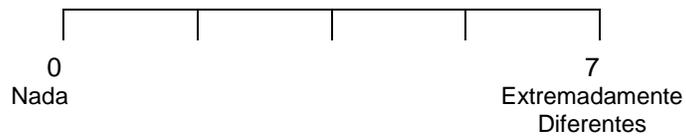
Muestra: **H99**

INSTRUCCIONES: Marque con una **X** en la escala de acuerdo a la diferencia que exista del atributo con respecto a la muestra control

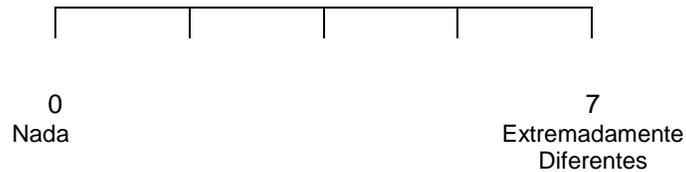
OLOR



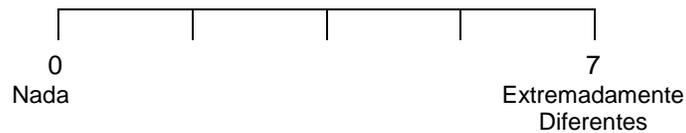
COLOR



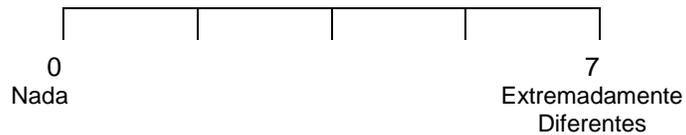
APARIENCIA



SABOR



TEXTURA



Observaciones y/o Comentarios

Gracias Por Su Participación

Formato (b) Utilizado en Evaluación Sensorial de la Etapa III

ANALISIS SENSORIAL DE SALCHICHA DE CALAMAR-VA

Nombre: _____

Fecha: _____

Muestra: **R15**

INSTRUCCIONES: Marque con una X para cada atributo si lo acepta o rechaza

Característica	Acepta	Rechaza	Motivo del Rechazo
OLOR			
COLOR			
APARIENCIA			
SABOR			
TEXTURA			

Observaciones y/o Comentarios

Muestra: **P20**

Característica	Acepta	Rechaza	Motivo del Rechazo
OLOR			
COLOR			
APARIENCIA			
SABOR			
TEXTURA			

Observaciones y/o Comentarios

Gracias Por Su Participación