



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

T E S I S

“EFECTO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS ENDÓGENAS Y UNA BACTERIANA EN LA FORMACIÓN DE EMULSIONES MODELO A PARTIR DE MÚSCULO ESTRIADO DE CAZÓN (*Rhizopriondon terraenovae*) Y CERDO”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

RAQUEL GARCIA BARRIENTOS

México, Distrito Federal 2007

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

Este trabajo de investigación fue realizado con una beca de grado otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

La etapa final de esta tesis fue financiada con una beca otorgada por la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, para alumnos en la etapa de redacción de tesis.

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

Raquel García Barrientos

El día 20 de Julio del 2007

Dra Isabel Guerrero Legarreta
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)
Directora

Jurado

Dra. María Lourdes Pérez Chabela
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)
Asesora

Dr. Gerardo Montejano Gaitán
(Instituto Tecnológico de Monterrey, Campus Querétaro)
Asesor

Dra Araceli Tomasini
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)

Dr. Alfonso Totosaús Sánchez
(Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec)

Agradezco...

A la *UAM-I* y Al *Posgrado en Biotecnología* por el apoyo obtenido durante mi estancia en las aulas, desarrollo y escritura de este proyecto.

Al *CONACyT* por la beca otorgada para realizar el doctorado.

A la *Dra. Isabel Guerrero*, por ser el timón de este trabajo, gracias por la confianza en éste proyecto, por sus consejos, por su paciencia, por estar siempre ahí para escucharme, por ayudarme a desenvolverme en la investigación, por las oportunidades que me han surgido...pero sobre todo por creer en mí para hacer este proyecto realidad.

A la *Dra. Lulú Pérez* por haber sembrado en mí la semilla de las enzimas...gracias!!... porque lo bien enseñado, además de que no se olvida...lo pude ampliar y desarrollar en éste proyecto, gracias por ser parte de él.

Al *Dr. Gerardo Montejano*, por sus sugerencias, observaciones y revisión realizada sobre este trabajo.

A los doctores *Araceli Tomasini* y *Alfonso Totosaus* por la revisión tan acertada de la tesis.

A la *Dra Edith Ponce* por su apoyo técnico y disponibilidad en todo momento.

A la *Dra. Susana Cofrades*, por tus consejos, por el apoyo moral, técnico y bibliográfico, desde tan lejos... pero sobre todo por tu amistad.

A los *doctores... Hugo, Tavo, Basy, y Luis* por su apoyo, sus consejos, por aquellos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, en las aulas, en los viajes.... sus ánimos para acabar este trabajo, pero sobre todo gracias por ser mis amigos.

A *Elvia y Miriam* quienes la experiencia les hace hablar, gracias! He aprendido mucho de ustedes, gracias por sus buenos consejos, por el intercambio técnico y bibliográfico... y las levantadas de ánimo.

A *Raquel (la che), Marisol, Lety y Rosa* por los momentos que vivimos durante la etapa experimental de trabajo, gracias por compartir conmigo momentos inolvidables.

A mis *compañeros y amigos* que estuvieron en el laboratorio compartiendo todo conmigo de los que queda su recuerdo y nuestra amistad.

A mi familia, de quién siempre tengo su apoyo y... para no excluir a nadie...
Gracias a todos los *García* y a todos los *Barrientos*.

... y dedico...

A **Dios** por que todos mis caminos están bajo tus ojos y tu consideras las veredas, porque siempre estas conmigo; en lo bueno y en lo malo, en lo triste y en lo alegre, en lo mucho y en lo poco.... Gracias porque tus promesas son para siempre y como hasta ahora...
Nunca estaré sola.

A **Raquel y Daniel** mis padres, por ser el pilar de mi vida, y ser la mejor guía que he tenido, porque en todo momento siento su apoyo, gracias por enseñarme como volar y animarme a emprender el vuelo y lo más importante por enseñarme acerca de la fuente de donde emana todo lo que somos: ***Aquel que nos amo primero.***

A **Ariz**, por comprenderme, apoyarme, por compartir mil momentos juntas desde hace varias lunas y buenas lecciones de vida... a ti hermanita.

A **Fer**, porque estando tan lejos siempre estas cerca... gracias por todo por tu apoyo durante este trabajo, por tu paciencia, y ánimo para terminar este proyecto. Gracias por los libritos y programitas de PC, pero sobre todo por estar siempre ahí.

Sinceramente....

Raquel



	Página
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	4
2.1 Generalidades de la carne	4
2.1.1 La carne	4
2.1.2 Fuentes de obtención	4
2.1.3 El músculo estriado	8
2.1.4 Proteínas de la carne	10
2.2 Funcionalidad de proteínas cárnicas: Emulsificación	15
2.2.1 Propiedades funcionales	15
2.2.2 Emulsificación	23
2.2.2.1 Estabilidad de emulsiones	25
2.2.2.2 Propiedades de las emulsiones	26
2.2.2.3 Caracterización de las propiedades de la emulsión	28
2.2.3. Proteínas miofibrilares como emulsificantes	31
2.2.3.1. Emulsiones cárnicas	32
2.2.3.2 Formación de una emulsión cárnica	33
2.3 Enzimas, alterantes en sistemas cárnicos	36
2.3.1 Enzimas proteolíticas	36
2.3.3.1 Clasificación de las endopeptidasas	37
2.3.2 Proteasas endógenas de la carne	39
2.3.2.1 Enzimas lisosomales: catepsinas	39
2.3.2.2 Enzimas citosólicas: calpains	43
2.3.3 Proteasas exógenas	45
2.3.3.1 Microorganismos productores de proteasas	46
2.3.3.2 Proteasas de <i>Pseudomonas</i>	49

2.4 Alteración de sistemas cárnicos	51
2.4.1. Alteraciones moleculares: Determinación por SDS-PAGE y producción de radicales –SH	51
2.4.2 Textura	52
2.4.3 Ultraestructura	54
2.4.4 Microbiología de carnes y pescado	55
2.4.5 Formación de aminas biogénicas	56
2.4.6 Métodos de conservación de carne	58
3. Objetivos	61
3.1 Objetivo General	61
3.2 Objetivos Particulares	61
4. Justificación	62
5. Materiales y Métodos	63
5.1. Obtención y almacenamiento de la carne de cazón y cerdo	63
5.2. Estrategia experimental	63
5.3 Estudios preliminares	66
5.3.1 Determinación de los parámetros de almacenamiento	66
5.3.2 Actividad enzimática endógena	66
5.3.3 Obtención del extracto enzimático a partir de <i>P. fluorescens</i>	67
5.4 Músculo estriado de cazón y cerdo	69
5.4.1. Actividad enzimática proteolítica	69
5.4.2 pH	71
5.4.3. Poblaciones microbianas	71
5.4.4. Concentración de aminas biogénicas	72

5.5. Extracto proteico	73
5.5.1 Extracción de las proteínas miofibrilares	74
5.5.2 Propiedades de emulsificación	74
5.5.3 Viscosidad aparente	76
5.5.4 Análisis moleculares	76
5.6. Formulación de la emulsión modelo	77
5.6.1 Viscosidad aparente	78
5.6.2 Distribución de proteínas en las fases (adsorbidas y no adsorbidas)	78
5.6.3. Microscopia óptica	79
5.7 Formación de geles a partir de de las emulsiones modelo	79
5.7.1. Formación de los geles proteicos	79
5.7.2 Análisis textural: penetración	79
5.7.3. Microscopía de barrido de electrones (SEM)	80
5.8 Diseño experimental y análisis estadístico	81
6. Resultados y Discusiones	84
6.1 Estudios Preliminares	84
6.1.1 Parámetros de almacenamiento	84
6.1.2 Actividad enzimática endógena	85
6.1.3 Actividad proteolítica del extracto enzimático de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	88
6.2 Materia Prima: Músculo estriado de cazón y cerdo	93
6.2.1 Actividad proteolítica debida a enzimas endógenas (EE) y exógena (EB)	93
6.2.2. pH	98
6.2.3 Poblaciones microbianas	101

6.2.4 Concentración de aminas biogénicas	107
6.3 Extracto Proteico	117
6.3.1 Propiedades de Emulsificación	117
6.3.2 Viscosidad aparente	125
6.3.3 Análisis Moleculares	127
6.4 Emulsiones Modelo	143
6.4.1 Distribución de tamaño de partícula	143
6.4.2 Viscosidad aparente	144
6.4.3 Distribución de proteína en las fases de las emulsiones modelo	146
6.4.4 Balance materia con respecto a la proteína en cada fase de la emulsión modelo	164
6.4.5 Microscopía óptica de emulsiones	170
6.5 Geles	172
6.5.1 Fuerza de penetración	172
6.5.2 Microscopía de barrido electrónico (SEM) de geles	175
7. Conclusiones	180
8. Recomendaciones y Perspectivas	183
9. Bibliografía	185
10. Anexos	215
11. Productividad	217

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Consumo de carne aparente en México en toneladas	5
Figura 2. Producción de carne de cerdo en México	6
Figura 3. Principales clases de proteasas (peptidasas) de acuerdo a Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology NC-IUBMB, 1992	37
Figura 4. Estrategia experimental	65
Figura 5. Muestras almacenadas después de 25 días a 15°C	84
Figura 6. Actividad proteolítica endógena máxima en carne de cazón	86
Figura 7. Actividad proteolítica endógena máxima en carne de cerdo	86
Figura 8. Crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a 30°C y 24 h, y halo generado por la hidrólisis del sustrato de caseína	89
Figura 9. Actividad proteolítica del extracto enzimático de la cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a pH 4	90
Figura 10. Actividad proteolítica del extracto enzimático de la cepa de <i>Pseudomonas fluorescens</i> a pH 7	90
Figura 11. Disminución del volumen de sustrato al aumentar la actividad de la enzima bacteriana	91
Figura 12. Electroforetograma en gel de caseína del extracto enzimático de <i>P. fluorescens</i> , M: Marcador de peso molecular; EB: enzima bacteriana; T: Tripsina	92
Figura 13. Actividad proteolítica (pH 4) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cazón	93
Figura 14. Actividad proteolítica (pH 6) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cazón	94
Figura 15. Actividad proteolítica (pH 4) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo	95
Figura 16. Actividad proteolítica (pH 6) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo	96

Figura 17. Actividad proteolítica (pH 7) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo	96
Figura 18. pH en músculo estriado de cazón	99
Figura 19. pH en músculo estriado de cerdo	99
Figura 20. Poblaciones de enterobacterias en carne de cazón	102
Figura 21. Poblaciones de enterobacterias en carne de cerdo	103
Figura 22. Poblaciones de psicrótrofos en carne de cazón	104
Figura 23. Poblaciones de psicrótrofos en carne de cerdo	105
Figura 24. Concentración de cadaverina en carne de cazón	108
Figura 25. Concentración de cadaverina en carne de cerdo	108
Figura 26. Concentración de putrescina en carne de cazón	111
Figura 27. Concentración de putrescina en carne de cerdo	111
Figura 28. Concentración de triptamina en carne de cazón	113
Figura 27. Concentración de triptamina en carne de cerdo	114
Figura 30. Concentración de TMA en carne de cazón	115
Figura 31. Capacidad de formación de emulsión de los extractos proteicos de carne de cazón	117
Figura 32. Capacidad de formación de emulsión de los extractos proteicos de carne de cerdo	118
Figura 33. Índice de actividad de emulsión de los extractos proteicos de carne de cazón	120
Figura 34. Índice de actividad de emulsión de los extractos proteicos de carne de cerdo	120
Figura 35. Estabilidad de emulsiones formadas por los extractos proteicos de carne de cazón	122
Figura 36. Estabilidad de emulsiones formadas por los extractos proteicos de carne de cerdo	123
Figura 37. Viscosidad aparente de los extractos proteicos de carne de cazón	125
Figura 38. Viscosidad aparente de los extractos proteicos de carne de cerdo	126
Figura 39. Concentración de grupos sulfhídrido en extractos proteicos de músculo de cazón	128

Figura 40. Concentración de grupos sulfhídrico en extractos proteicos de músculo de cerdo	128
Figura 41. Electroforesis de los extractos proteicos de cerdo y cazón a tiempo = 0 I. cadena pesada de miosina; II. actinina y otras proteínas; VI. Actina; V. tropomiosina y troponina T; VI. cadenas ligera de miosina	131
Figura 42. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	134
Figura 43. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días a 4°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana	135
Figura 44. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días a 15°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana	136
Figura 45. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	139
Figura 46. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días a 4°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana	140
Figura 47. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días a 15°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana	141
Figura 48. Tamaño de partícula de las emulsiones con respecto al tiempo de homogenización del sistema	143
Figura 49. Viscosidad aparente de la emulsión de cazón	144
Figura 50. Viscosidad aparente de la emulsión de cerdo	145
Figura 51. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares y emulsión de cazón y cerdo M: marcadores; 2 y 6: proteínas miofibrilares; 3 y 7: emulsión centrifugada; 4 y 8: proteína no adsorbida; 5 y 9: proteínas adsorbidas	146
Figura 52. Densitogramas de extractos de proteínas miofibrilares y emulsiones de	147

cazón M: Marcadores; 2: proteínas miofibrilares; 3: emulsión centrifugada; 4: proteínas no adsorbida; 5: proteínas adsorbidas	
Figura 53. Densitogramas de extractos de proteínas miofibrilares y emulsiones de cerdo M: Marcadores; 2: proteínas miofibrilares; 3: emulsión centrifugada; 4: proteínas no adsorbidas; 5: proteínas adsorbidas	147
Figura 54. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cazón adsorbidas en la interfase M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	150
Figura 55. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón adsorbida en la interfase	151
Figura 56. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cazón no adsorbidas en la interfase M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	154
Figura 57. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón no adsorbida en la interfase	155
Figura 58. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cerdo adsorbidas en la interfase M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	158
Figura 59. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo adsorbida en la interfase	159
Figura 60. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cerdo no adsorbidas en la interfase M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas; EB: efecto de enzima bacteriana	161
Figura 61. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo adsorbida en la interfase	162
Figura 62 Porcentaje de proteína en cada fase de las emulsiones de cazón.	168
Figura 63 Porcentaje de proteína en cada fase de las emulsiones de cerdo.	169
Figura 64. Emulsiones diluidas O/W con proteínas miofibrilares de cazón y cerdo, a diferentes tiempos de homogenización	171
Figura 65. Emulsiones concentradas O/W con proteínas miofibrilares a 5 min de homogenización. A) Proteínas de cazón; B) proteínas de cerdo	172

Figura 66. Trabajo de penetración en geles proteicos de cazón y de cerdo	173
Figura 67. Micrografías (500x) de geles de cazón a 0 y 15 días de almacenamiento A: t=0; B: EE, 4°C; C: EB, 4°C; D: EE, 15°C; E: EB, 15°C	176
Figura 68. Micrografías (500x) de geles de cerdo a 0 y 15 días de almacenamiento A: t=0; B: EE, 4°C; C: EB, 4°C; D: EE, 15°C; E: EB, 15°C	178

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Producción Pesquera en México (Toneladas en peso vivo)	7
Tabla 2. Clasificación de las propiedades funcionales según Kinsella (1976)	16
Tabla 3. Clasificación de las propiedades funcionales según Morrisey (1987)	16
Tabla 4. Clasificación de las propiedades funcionales	17
Tabla 5. Clasificación de las propiedades funcionales según Van der Ven y col., (2002)	17
Tabla 6. Fuerzas moleculares involucradas en la conformación de una proteína	19
Tabla 7. Principales características de algunas catepsinas <i>in Vitro</i>	41
Tabla 8. Gradientes de metanol empleados en la elución del análisis de aminas biogénicas	73
Tabla 9. Variables de respuesta analizadas	83

Índice de anexos

	Página
Anexo I. Determinación de proteína por el método de biuret	206
Anexo II. Curva patrón del marcador de pesos moleculares utilizado en SDS-PAGE	207
Anexo III. Medio de cultivo para el crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	207
Anexo IV. Cromatograma de separación aminas biogénicas determinadas en la carne de cazón y cerdo por HPLC	208
Anexo V. Análisis de Varianza: músculo estriado de cazón, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos	209
Anexo VI. Comparación múltiple de medias de Duncan: músculo estriado de cazón, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos	210
Anexo VII. Análisis de Varianza: músculo estriado de cerdo, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos	211
Anexo VIII. Comparación múltiple de medias de Duncan: músculo estriado de cerdo, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos	212
Anexo IX. Análisis de varianza: especies animales (cazón y cerdo)	213
Anexo X. Comparación múltiple de medias de Duncan: entre especies, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos	214

Resumen

Se realizó un estudio comparativo sobre el efecto de la actividad proteolítica endógena y exógena sobre las proteínas miofibrilares de cerdo y cazón en la formación de una emulsión proteica modelo. Por estudios preliminares se seleccionaron las condiciones de almacenamiento: dos temperaturas de almacenamiento, 4 y 15°C, por un periodo de 15 días. Se estudiaron dos tratamientos, uno con enzimas endógenas EE (catepsinas y calpains) y otro por la acción de una enzima bacteriana EB producida por *Pseudomonas fluorescens*, la cual fue aislada e identificada en carne de res y caracterizada en nuestro laboratorio.

Para identificar los posibles cambios generados por los dos tratamientos enzimáticos sobre el sustrato cárnico y su efecto en la formación de una emulsión modelo, se emplearon cuatro sistemas experimentales: a) Músculo estriado de cerdo y cazón (variables de respuesta: actividad proteolítica endógena y exógena, pH, poblaciones microbianas y concentración de aminas biogénicas); b) Extracto de proteínas miofibrilares de cerdo y cazón (variables de respuesta: propiedades de emulsificación, viscosidad aparente y análisis moleculares); c) Emulsiones modelo formadas con extractos proteicos de cerdo y cazón (variables de respuesta: viscosidad aparente y distribución de las proteínas en las fases) y d) Geles formados a partir de las emulsiones modelo (variables de respuesta: fuerza de penetración y ultraestructura de los geles). Todas las mediciones se realizaron a los 5, 10 y 15 días de estudio; estos días de muestreo se eligieron debido a que en estudios histoquímicos reportados en la literatura, las enzimas endógenas mostraron movilidad a lo largo de la fibra cerca del quinto día.

Los análisis realizados sobre el músculo estriado mostraron diferencias en la actividad proteolítica, mayor a 15°C con músculo tratado con EB en muestras de cazón, y menor en cerdo. El pH en todo el estudio fue más alto para muestras de cazón. Las poblaciones microbianas analizadas (enterobacterias y psicrótrofos) mostraron valores similares, lo que permitió concluir que el extracto enzimático de EB estaba libre de células. Además, el empacado al vacío fue un método adecuado de conservación. Las concentraciones de aminas biogénicas estudiadas en ambas especies (cadaverina, putrescina y triptamina)

aumentaron con el tiempo de almacenamiento, siendo más notable a 15°C. Asimismo, la trimetilamina determinada en el cazón, aumentó con el tiempo y la temperatura.

Las propiedades emulsificantes del extracto proteico (capacidad de emulsión, índice de estabilidad de emulsión y estabilidad de emulsión) disminuyeron con el tiempo, siendo más notable en el cazón que en el cerdo. La viscosidad aparente del extracto proteico aumentó en ambas especies con el tiempo de almacenamiento. Los análisis moleculares mostraron la aparición de nuevos péptidos de peso molecular mas pequeño al incrementar el tiempo de estudio, suponiéndose que se debieron a degradación proteica.

La distribución de las proteínas en la fase acuosa y en la interfase del sistema emulsión, tuvieron comportamiento diferente en ambas especies, con cambios más notables en las proteínas extraídas de cazón que en las de cerdo, particularmente en miosina y proteínas de pesos moleculares menores a 45 kDa.

Los geles formados a partir de las emulsiones modelo de cerdo, fueron más duros (mayor trabajo de penetración) que los de cazón, tanto para muestras tratadas con EE como con EB. Por último, el análisis por microscopía de los geles mostraron diferencias en el tamaño del debido a la temperatura de la carne; a 4°C el tamaño de glóbulo, en ambos tratamientos enzimáticos y en ambas especies animales, fue mas pequeño que a 15°C.

El presente estudio permitió concluir que la alteración de sustratos musculares por microorganismos psicrótrofos, tales como pseudomonas, puede ser indicio de la pérdida de la calidad de la carne destinada para la elaboración de productos cárnicos, debido a la degradación de las proteínas miofibrilares, y en consecuencia alterando al producto final.

Por otro lado, los resultados obtenidos indicaron que el cazón podría ser es una alternativa en la elaboración de productos cárnicos de tipo no convencional, al ser incluido como un ingrediente o en combinación con carne de especies animales terrestres, mejorando la actividad superficial de las proteínas.

Summary

Comparative studies on the effect of endogenous and exogenous proteolytic activity upon myofibrillar proteins of pork and sharp nose shark and the formation of protein emulsion was carried out. Storage conditions were defined in preliminary tests: 4 and 15°C for 15 days total study time. Two treatments were applied: endogenous enzymes, EE (calpains and cathepsins; and a bacterial enzyme, EB, produced by *Pseudomonas fluorescens*, previously isolated from beef and characterized in our laboratory.

In order to study possible changes on the meat, promoted by these treatments, as well as its effect on the formation of a model meat emulsion, four experimental systems were considered: a) Pork and shark striated muscles (response variables: endogenous proteolytic activity, pH, microbial populations and biogenic amine concentration; b) Protein extract, obtained from the striated muscle of pork and shark (response variables: emulsifying properties, apparent viscosity and molecular analysis); c) Emulsions formed by pork and shark myofibrillar proteins (response variables: apparent viscosity and phase protein distribution); d) Gels formed from pork and shark emulsions (response variables: penetration work and ultrastructure). Analysis were carried out at 5, 10 and 15 days, due that reported histochemical studies demonstrated that endogenous enzymes start migrating within the muscle fiber around day 5 after slaughtering.

Enzyme activity analysis of the striated muscles showed differences between animal species; the highest proteolysis occurred in shark muscle stored at 15°C in muscle and treated with EB. At the same time, pH was also higher in shark than in pork throughout the study. Microbial loads (enterobacteria and psychrotrophs) were similar for both species. Low microbial populations also demonstrated that vacuum packaging was a suitable preservation method. Biogenic amines found in both species were cadaverine, putrescine and tryptamine; all of these compounds increased throughout storage, higher values were observed in samples stored at 15°C. Trimethyl amine, analyzed in shark samples, was also higher at 15°C, increasing with the study time.

Emulsifying properties analyzed in the protein extract were: emulsifying capacity, emulsion stability index and emulsion stability. All of them decreased with time, more noticeable in shark than in pork samples. Protein extract apparent viscosity increased with time in both animal species, whereas molecular analysis showed that low molecular weight peptides appeared with study time, probably due to protein degradation.

Protein distribution between the aqueous phase and the emulsion interface was different in pork and in shark samples. This effect was mainly due to changes in myosin and >45 kDa molecular weight proteins, more noticeable in pork than in shark.

The gels formed from model pork protein emulsions were softer (less penetration force) than for shark emulsions. Finally, light and scanning electron microscopy of the gels showed that storage temperature affects stabilization of the fat globule by proteins; fat globules of emulsions made from meat samples stored at 4°C were smaller than from samples stored at 15°C. Similar effect was observed for the two animal species and the two treatments (EB and EE).

From this study, it can be concluded that meat substrates are altered if contaminated by psychrotrophs, such as protease-producing pseudomonads. These alterations resulted in a decrease in meat functionality, used for product fabrication, due that myofibrillar proteins are depleted, resulting in alteration of the final product. At the same time, functionality of shark proteins indicate that meat of this species could be an alternative for product fabrication or additive of for non-conventional products, as surface protein activity of land animals could be improved by shark proteins.

1. Introducción

Una cantidad considerable de los productos cárnicos comercializados constituyen sistemas de emulsión-gel (Correia y Mittal, 1992; Gordon y Barbut, 1997; Mittal, 2005). La producción de estos implica la desintegración de la estructura muscular por métodos mecánicos, lo que ocasiona la liberación de proteínas. Por otra parte, las proteínas son extraídas en presencia de sales formando un sol que posteriormente se convierte en emulsión (Mittal y col., 1987; Correia y Mittal, 1992). Al aplicar calor (70 a 90°C) a esta emulsión se forma un gel, transformándose de un sistema fluido (emulsión) a un sistema no fluido (gel) (Foegeding y col., 1996). El tratamiento térmico, además de promover la formación del gel, destruye una parte importante de la población microbiana nativa, además de inactivar a enzimas endógenas y exógenas presentes, aumentando la vida útil del producto. El mecanismo de formación del gel se inicia con la desintegración de la fibra muscular por acción mecánica, liberándose a las proteínas, principalmente las miofibrilares; al suministrar calor los fragmentos de proteínas interaccionan formando una matriz estabilizada por la formación de puentes intermoleculares debidos a la acción de iones di o multivalentes, a la formación de puentes disulfuro, y a interacciones electrostáticas (fuerzas de van der Waals, puentes de H, etcétera), entre otras reacciones. Las características físicas del gel cárnico depende de factores tales como materia prima (proporción de tejido graso/tejido magro, uso de vísceras), especie animal empleada, manejo antemortem y postmortem y tratamiento aplicado.

Las enzimas proteolíticas que afectan a la calidad de los productos cárnicos son de dos tipos: endógeno y exógeno. Las proteasas endógenas, son nativas de la carne, presentes en el músculo vivo e inactivas en el músculo sano, sin embargo una desorganización funcional de estas enzimas, se ha observado su participación en algunas patologías, como distrofia muscular, desordenes neurológicos (Alzheimer), diabetes del tipo II y cáncer de tipo gástrico (Cheret, 2005; Goll., 1991). Por su origen celular, son de dos tipos: catepsinas y calpainas. Las catepsinas son de origen lisosomal, se encuentran en todas los lisosomas de las células con excepción de las glóbulos rojos. Las catepsinas B, D, H y L son las mejor caracterizadas en el estudio de la carne, tanto de origen terrestre como marino. Actúan a pH ácidos aunque también se ha observado que son activas a pH básicos (Somoza y col., 2000). Su especificidad radica en el aminoácido del sitio

catalítico que interviene en la hidrólisis de la proteína. Por otro lado, las calpains son enzimas que se encuentran en el sarcoplasma de la célula muscular y son dependientes de calcio. Son la m-calpaina y la μ -calpaina, el pH de actividad es de neutro a básico y a una temperatura de 37°C. y son catalogadas en la familia de las cisteín proteasas (Polidori y col., 2001).

La asociación de estos dos sistemas de enzimas da como resultado la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento, promoviendo la maduración de la carne de animales terrestres, que a condiciones razonables de almacenamiento, implica cambios profundos en características fisicoquímicas como textura, olor, sabor, etcétera (Koohmaraie, 1992; Taylor y Goll., 1995; Jaarsveld y col., 1997; Sancho y col., 1997; Pérez-Chabela y col., 1998). Mientras estos cambios son aceptados para la obtención de una buena calidad en carne de animales terrestres, en los animales marinos esto implica descomposición (Delbarre-Ladrat y col., 2004).

Por otro lado, el estudio sobre estos sistemas catalíticos en carne de animales marinos, ha recibido limitada atención, comparada con los extensos estudios en animales terrestres (Toyohara y Makinodan, 1989; Jiang y col., 1991; Geesink y col., 2000; Delbarre-Ladrat y col., 2004).

Las enzimas exógenas se producen por microorganismos que ingresan a la carne en las operaciones de captura, matanza y manejo, y se seleccionan con base en las características intrínsecas de la carne, aunque algunos factores extrínsecos como la temperatura y la humedad de las cámaras de refrigeración también afectan a esta selección. Durante el proceso de maduración y posterior descomposición de la carne, las principales microbianas que degradan a la carne son proteasas, peptidasas y lipasas (Carballo y López de Torre., 1991; Delbarre-Ladrat y col. 2006).

Durante el almacenamiento en refrigeración, proceso muy utilizado para conservar los productos cárnicos emulsionados, se favorece un ambiente selectivo en el que preferentemente crecen microorganismos psicrótrofos (Brackett, 1992), muchos de estos productores de enzimas proteolíticas (Patel y col., 1986; Rajmohan y col., 2002). Algunas de las bacterias psicrótrofas, cuya actividad es determinante sobre las proteínas miofibrilares de la carne a temperaturas de refrigeración son: *Pseudomonas fragi* (Tarrant y col., 1971; Alanís-García y col., 1999), *P. fluorescens* (Alanís-García y col., 1999), *Leuconostoc. Mesenteroides* y *Pediococcus cerevisiae* (Borton, 1970), las cuales degradan a las proteínas y pueden alterar la materia prima durante alguna de las etapas de proceso de producción de productos cárnicos emulsionados.

Debido a lo anterior, surgió el interés de estudiar el efecto que producen enzimas de tipo endógeno y exógeno. Éstas últimas ejemplificadas por una enzima producida por un microorganismo psicrótrofo en la formación de una emulsión modelo cuya proporción de proteína es igual a la de una salchicha tipo Frankfurt, utilizando las proteínas miofibrilares de carne de cerdo -como especie convencional en la elaboración de productos cárnicos emulsionados- y de cazón -como una alternativa en la elaboración de este tipo de productos-, ambas materias primas almacenadas bajo condiciones de refrigeración y a temperaturas de abuso acelerado.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Generalidades de la carne

2.1.1 La carne

La carne ha sido catalogada en todo el mundo como uno de los principales alimentos del consumo humano (Foegeding y col., 1996; Lawrie, 1998), debido a su valor nutricional ya que contiene los 9 aminoácidos esenciales en las proporciones que ha definido la FAO como necesarias en el consumo diario (FAO, 1981), además que es un alimento muy valorado por un amplio sector de la población mundial, debido a sus propiedades organolépticas (Lawrie, 1998).

2.1.2 Fuentes de obtención de Carne

La carne, es definida como el músculo estriado después de pasar por una serie de cambios bioquímicos, se obtiene de más de 300 especies animales de origen terrestre o marino. Los cambios bioquímicos comienzan después de un paro respiratorio y cardiaco generalizado ocurrido en el sacrificio y terminan en el establecimiento y resolución del *rigor mortis*. Estos cambios ocurren en un lapso de horas o días, dependiendo de la velocidad metabólica de la especie (Rocalés y col., 1995).

Los principales procesos bioquímicos que ocurren en ésta conversión se dividen en dos fases: *rigor mortis* y *post rigor*. Durante la primera fase los músculos pierden sus propiedades elásticas aumentando su dureza y por lo tanto se tornan inextensibles como resultado del ciclo de la glucólisis (Embden-Meyerhoff) en condiciones de anaerobiosis, ocasionada por la falta de aporte de oxígeno al cesar la circulación de la sangre y de nutrientes, y se produce un decremento del pH debido a la formación de ácido láctico. Aunado a esto, disminuye la concentración del ATP por lo que el aporte de energía se limita. Una vez que termina este proceso aparece la segunda fase, la

la rigidez cadavérica o *post rigor*, en la cual se produce una disminución de la dureza (Roncalés y col., 1995), aumento pH y de otras propiedades como el sabor y el olor.

Especies terrestres

Las especies terrestres destinadas para el consumo humano son aquellas que viven en medios de tierra firme, ya sea en cautiverio o en medios salvajes. El consumo de carnes en México es principalmente de bovinos, porcinos y pollos, y en menor porcentaje de caprinos, ovinos y pavos. La figura 1 muestra el consumo aparente de la carne en México.

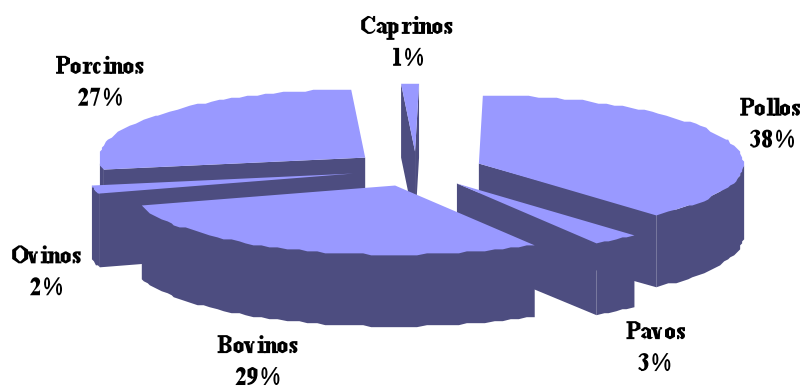


Figura 1. Consumo de carne aparente en México en toneladas (SIAP, 2006a)

El cerdo

El cerdo (*Sus domesticus*) es una de las especies de carne más producidas y consumidas en México; las principales razas que se explotan en nuestro país son Landrace, York, Duroc, y Hampshire. El cerdo ocupa el tercer lugar en consumo aparente en México, después de la carne de pollo y de bovino, y constituye una fuente importante de proteína de alta calidad en la dieta de varios países, incluyendo México. De la población total de cerdos en el ámbito mundial se estima que entre 25% a 35% es de producción local, la cual procede de razas que, en muchos casos, no están bien definidas ni caracterizadas, pero constituyen una base importante para los programas de cruzamiento (Méndez-Medina y col., 2002).

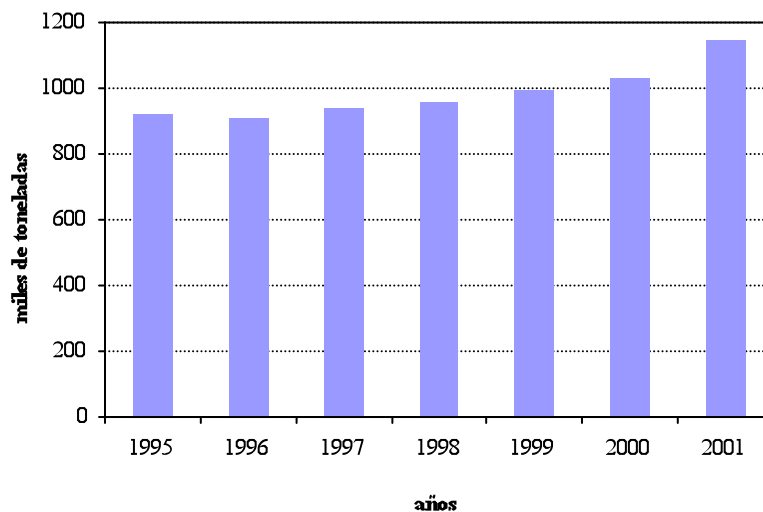


Figura 2. Producción de carne de cerdo en México (SIAP, 2006a)

La composición química de la carne de cerdo varía con respecto a factores tales como raza, sexo y edad; los valores medios de los principales componentes químicos son: 70-75% de agua, 20-25% de proteína, 4-8% de lípidos y 1% de carbohidratos. La relación agua/proteína se mantiene constante y es un parámetro que indica la calidad de la carne, por otra parte el contenido de los lípidos varía dependiendo de la procedencia del músculo (Lawrie, 1998). La carne de cerdo es caracterizada por ser una carne roja con mayor proporción de grasa en comparación con otras especies terrestres, de ahí su importancia en la industria de alimentos para la elaboración de productos cárnicos emulsificados y productos madurados como jamones, tocinos, chuletas y chorizos. Además, se aprovechan otros tejidos (músculos lisos y cardiaco, piel y sangre) para la elaboración de productos alternos (Pérez-Casas y col., 1999).

Especies marinas

Los productos alimenticios de origen marino son derivados de diversos tejidos como el cuerpo del animal, el músculo estriado, las huevas, el estómago, la piel, el hígado y las aletas (Sikorski y col., 1995; Schmidtsdorff, 1995; Rustad, 2003). Las especies acuáticas destinadas para el consumo humano viven en medios tales como océanos, ríos, lagunas, lagos, o son producidas en cautiverio. La mayor parte de las especies marinas habitan en las zonas costeras y continentales (hasta 200 m de profundidad); se conocen cerca de 8,000 especies en aguas cálidas y unas 1,130

especies en aguas frías (De Groot, 1999). En la tabla 1 se muestra la producción pesquera en México de las especies de mayor producción.

Tabla 1. Producción Pesquera en México (Toneladas en peso vivo)
(SIAP, 2006b)

AÑO	ESPECIE								
	Atún	Camarón	Mojarra	Ostión	Sardina	Carpa	Bagre	Trucha	Cazón
2000	120.655	61.597	5.569	49.710	137.581	24.240	2.851	2.622	27.443
2001	142.649	57.509	5.555	50.585	138.789	21.037	2.294	3.309	25.695
2002	162.319	54.633	4.079	48.878	184.239	22.480	2.313	3.445	24.383
2003	166.875	61.544	5.685	48.291	189.115	22.189	2.516	3.734	26.611
2004	106.694	53.656	5.257	49.026	188.147	22.487	1.844	3.278	25.131
2005	129.906	56.411	6.178	48.339	189.075	22.344	2.625	3.998	26.123

La composición química del músculo estriado de los animales marinos se diferencian de la de los animales terrestres en cuanto a la concentración de proteína y el bajo contenido en grasa, a la vez la composición química del músculo de los animales acuáticos vertebrados varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año. En promedio, esta composición es: 78-83% de agua, 16-21% de proteína, 0.1-2.5% de lípidos (aunque varía ampliamente si se trata de especies magras o grasas) y 0.25% de carbohidratos (Love y Elerian, 1964; Stansby, 1962).

El cazón

El cazón ocupa el quinto lugar en producción pesquera para consumo directo a nivel nacional (tabla 1), se captura tanto en el Océano Pacífico como en el Golfo de México; sin embargo, en esta última región se observan signos de sobreexplotación de acuerdo al Anuario Estadístico de Pesca 1994-2002 (SIAP, 2006b).

Tradicionalmente la captura de tiburón en México se clasifica en dos categorías: de cazón y de tiburón. La primera se refiere a los organismos de talla menor a 1.5 m de largo, mientras que el la segunda los ejemplares exceden dicho tamaño.

El cazón pertenece a la familia de los elasmobranquios, en los que se incluyen a los tiburones y las rayas. Se tienen registrados varias especies de cazón; aquellos que se capturan en el Golfo de California y en el Océano Pacífico son: cazón californiano (*Galeorhinus galeus*), cazón mamón (*Mustelus henlei*, *M. lunulatus*, entre otros), y cazón bironche (*Rhizoprionodon longurio*). Los cazones capturados en el Golfo de México son: cazón cabeza de pala (*Sphyma tiburo*), cazón canguay (*Carcharhinus acronotus*) y cazón de ley (*Rhizoprionodon terraenovae*), siendo este último el más abundante (Rodríguez de la Cruz y col., 1996). Entre las principales características del cazón es que existe dimorfismo sexual en talla y peso (las hembras son más grandes en talla y peso que los machos), presenta pesos máximos entre los 5 y 200 kg, las tasas de crecimiento que se presentan son muy lentas, tiene una madurez sexual tardía (entre los 3 y 4 años), y su longevidad es prolongada, alrededor de los 10 años (Castro, 1987; Castro, 1993). El cazón de ley (*Rhizoprionodon terraenovae*) ha sido estudiado por centros de investigación ubicados en el Golfo de México, en aspectos de comportamiento y circuito migratorio norte-sur por medio de sensores, donde se han observado sus estadios de reproducción y muerte estacionales, con el fin de controlar a la población y la captura, con el fin de satisfacer la demanda del consumo de carne (Carlson y Baremore, 2004; Gurshin y Szedlmayer, 2004; Hoffmayer y col., 2006).

La carne del cazón es catalogada como “carne azul”, debido a la apariencia que presenta debida al contenido de grasa, mayor que otros peces; sin embargo, debido al contenido de mioglobina la carne del cazón es catalogada como roja, en comparación con otros peces (Eroski, 2006).

2.1.3 El músculo estriado

Las canales de los animales están formados por 3 tipos de tejidos: muscular, adiposo y óseo. El tejido muscular a su vez es de tres tipos: estriado, liso y cardíaco (Forrest y col., 1975; Cheftel y col., 1989); el músculo estriado, que ocupa a este trabajo de tesis, es capaz de producir energía química para convertirla en movimiento mecánico y de trabajo; estos músculos se fijan al

esqueleto o a otros músculos. La carne comestible, también llamada pulpa en animales acuáticos vertebrados, corresponde a los músculos estriados.

La canal de animales terrestres esta dividida en grupos de músculos estriados de acuerdo a su función, localización y tamaño, mientras que los músculos estriados de los animales acuáticos vertebrados solo se dividen en ventrales y dorsales, estos últimos son los más importantes por representan la fracción comestible. A diferencia de los animales terrestres, los músculos de los animales marinos vertebrados carece del sistema tendinoso (tejido conectivo) que conecta los paquetes musculares al esqueleto del animal. En cambio, los peces tienen células musculares que corren en paralelo, separadas perpendicularmente por tabiques de tejido conectivo llamados miocomatas, ancladas al esqueleto y a la piel. Los segmentos musculares situados entre estos tabiques de tejido conectivo se denominan miotomas y están divididos por membranas finas de tejido conectivo llamadas mioseptos; cada segmento está compuesto de fibras musculares conocidos como miotomas que se despliegan a lo largo del músculo (Barroso y col., 1998).

Los músculos estriados, tanto de los animales terrestres, están formados por fibras musculares, las cuales están rodeadas por una membrana llamada sarcolema formada de tejido conectivo (Cheftel y col., 1989). La fibra muscular es multinucleada, estrecha y larga, y se extiende a lo largo del músculo alcanzando una longitud hasta de 34 cm (Walls, 1960). Esta a su vez está compuesta de miofibrillas, cilindros largos y finos de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, con el eje paralelo al de la fibra muscular, extendiéndose por todo lo largo de ésta (Forrest y col., 1975; Fox y Condon, 1982).

Los cortes transversales de las miofibrillas de ambas especies presentan elementos estructurales llamados filamentos (gruesos y delgados) dando la apariencia de bandas oscuras y claras al observarse al microscopio de luz polarizada; a la banda clara se le conoce como banda I (isotrópica), a la banda gruesa, amplia y oscura, que presenta doble refringencia se conoce como banda A (anisotrópica). La banda I esta dividida por una línea oscura llamada línea Z, una estructura densa y tridimensional (Vigoreaux, 1994). La sección de la miofibrilla comprendida entre dos líneas Z se le llama sarcómero; está compuesto por una banda A y dos medias bandas I que se localizan en cada lado de la banda A; por tanto el sarcómero es la unidad repetitiva de la

miofibrilla, así como la unidad básica de la contracción y relajación del músculo (Price y Schweigert, 1981; Fox y Condon., 1982). Cada músculo esta rodeado de una capa gruesa de tejido conectivo que penetra al músculo y recibe el nombre de epimisio, de él parten elementos de tejido conectivo que dividen al músculo en grupos de fibras llamándose a estas membranas perimisiales que penetran en los haces de fibras y a la vez rodean cada una de las fibras individuales, estas últimas membranas reciben el nombre de endomisio (Carballo y López de Torre, 1991).

2.1.4 Proteínas de la carne

Las proteínas del músculo esquelético se clasifican de acuerdo a su forma (globulares o fibrosas), localización celular (extracelulares, intracelulares) o solubilidad-función-localización (sarcoplásmicas, miofibrilares, conectivas) (Forrest y col., 1975), siendo esta última clasificación la más usada. En este sentido, se clasifican como del tejido conectivo o estromas, solubles en medio neutro (elastina, colágena y reticulina); del sarcoplasma, solubles en solución salina diluida (se incluyen enzimas hidrosolubles y pigmentos); y miofibrilares, son solubles en soluciones salinas concentradas (Lawrie, 1998).

Proteínas del tejido conectivo

Uno de los principales objetivos del tejido conectivo en el músculo es el de soporte de las fibras musculares y transmisión del esfuerzo y de contracción para la producción del movimiento, por lo anterior es una estructura mecánicamente muy resistente. El tejido conectivo existe en forma de láminas o bandas compuestas de hilos de fibras formadas por tres tipos de proteínas: colágena, elastina y reticulina (Valin, 1995). La colágena es la proteína más abundante del tejido conectivo, contiene 30% de glicina y 25% de prolina e hidroxiprolina. La abundancia de estos aminoácidos es la causa de la rigidez de la colágena. La unidad básica de la colágena es la tropocolágena, estructura larga y delgada, formada por tres cadenas de polipéptidos fuertemente enlazados que dan firmeza y forma; estos enlaces se rompen durante el cocimiento de la carne (Carballo y López de Torre, 1991). El contenido de colágena en el músculo de vertebrados marinos es menor al de los vertebrados terrestres variando de 1 a 12% del total de proteínas y del 0.2 a 2.2% del

peso húmedo del músculo (Sikorski y col., 1990). Otra diferencia entre el colágena del músculo de animales acuáticos y terrestres está en el contenido de hidroxiprolina: tan solo 4.7 a 10.0% en animales acuáticos y hasta 25% en animales terrestres (Sikorski y col., 1990). La elastina, es una proteína presente en proporciones menores en la piel, en el tejido adiposo y en el tejido conectivo, provee resistencia y elasticidad. La reticulina se encuentra en concentraciones bajas, excepto en el *ligamentum nucae* de los bovinos y en el tendón de Aquiles de esta especie; es más resistente que la colágena y bioquímicamente parecida a esta, probablemente une a la colágena en el endomisio constituyendo ligamentos flexibles (Swatland, 1996).

Proteínas sarcoplásmicas

Se llaman así por su localización en el sarcoplasma de la célula muscular; en esta clasificación están incluidos las proteínas solubles en agua, tales como algunas enzimas y algunos pigmentos. Las enzimas presentes en el sarcoplasma tienen pocas propiedades funcionales, pero son importantes por su actividad bioquímica de transporte y almacenamiento de oxígeno. Desde el punto de vista de producción de carne de animales terrestres, la proteína sarcoplásmica más importante es la mioglobina responsable del color. Las proteínas sarcoplásmicas de vertebrados acuáticos son semejantes a los de animales terrestres -mioglobina, enzimas y otras albúminas- sin embargo en los animales acuáticos existen concentraciones considerables de proteínas que ligan Ca^{2+} denominadas parvalbúminas, cuyo peso molecular es de 12 kDa (Gazzaz y Rasco, 1993). Dentro de las proteínas sarcoplásmicas se encuentran también a las enzimas del citoplasma y lisosomales, como oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas e isomerasas; estas enzimas actúan en el desarrollo y crecimiento del animal tanto terrestre como marino (Carballo y López de Torre, 1991; Delbarre-Labrat y col. 2006).

Proteínas miofibrilares

Se encuentran localizadas en la miofibrilla, se dividen en contráctiles reguladoras y de los filamentos intermediarios. Las proteínas contráctiles están directamente relacionadas con la contracción y relajación muscular, son las responsables de la conversión de energía química a mecánica; también son responsables de la textura de la carne. La miosina y la actina son las

proteínas miofibrilares más abundantes, constituyen en conjunto el 75 a 80% de las proteínas de la miofibrilla (Forrest y col., 1975). La proporción de proteínas miofibrilares respecto del total de proteínas musculares es más elevada en los animales acuáticos que en los terrestres, sin embargo las cantidades relativas de componentes individuales son similares (Sikorsky., 1990; Skaara y Regenstein, 1990)

La miosina es la proteína mas abundante, comprende aproximadamente el 50% del contenido total de la proteína muscular (Harrington y Rodgers, 1984; Ko y col., 2004), más de una tercera parte de la proteína del músculo, su peso molecular es de aproximadamente 500 kDa conformada por 4 cadenas; dos cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 200 kDa cada una y hasta cuatro cadenas ligeras de 16 a 30 kDa; estos pesos dependen de la especie del animal y del músculo (Lawrie, 1998). Es una estructura larga de aproximadamente 2x160 nm, con estructura de α -hélice con dos cabezas globulares de aproximadamente 5x20 nm. La mitad de las cabezas globulares empiezan con un grupo carboxílico que a su vez está unido a la cola de una α -hélice. Se han realizado numerosos estudios sobre la estructura de la miosina en diferentes animales, se han encontrado isoformas de la miosina dentro de la misma especie, y aún entre diferente tipo de músculos de la misma especie, pero las propiedades generales como el peso molecular y la secuencia de aminoácidos son similares (Harrington y Rodgers, 1984; Skaara y Regenstein, 1990). En los animales acuáticos se han encontrado diversos tipos de miosinas con diferentes distribuciones de cadenas ligeras; en el músculo blanco de la caballa se encontraron 3 subunidades de cadena ligera similar a la encontrada en los músculos rápidos del conejo (Focant y col., 1981). Además de las isoformas encontradas en función a la especie y localización muscular, existen isoformas debido al habitat, ya que la miosina de algunas especies de peces de agua frías es menos estable que la de peces tropicales (Johnston y col., 1973; Johnston y col., 1975; Misima y col., 1990). La cinética de desnaturalización de la miosina también presenta variaciones entre animales terrestres y acuáticos; la de animales acuáticos se desnaturaliza y agrega más rápido que la de los animales terrestres tanto a temperatura ambiente como de refrigeración y congelación (Connell, 1960), lo anterior está influenciado por la formación de enlaces disulfuro al ocurrir la desnaturalización de la proteína (Jiang y col., 1988).

La miosina tiende a fragmentarse en la proximidad de la cabeza globular por la acción de enzimas proteolíticas, como la tripsina, dando como consecuencia 2 fracciones proteicas: la meromiosina pesada de aproximadamente 350 kDa que consta de un residuo de cola y las dos cabezas globulares, y la otra fracción (la meromiosina ligera de 150 kDa) que es un trozo de cola (Hultin, 1993). Sin embargo, cuando la miosina es tratada con papaína, esta actúa sobre la unión de cabeza-cola de la molécula, originándose dos fracciones, S1 que está formada por 2 cabezas globulares, y la cola formada por el residuo helicoidal (Visessanguan y col., 2000). La paramiosina es una proteína presente solo en animales acuáticos invertebrados, como mejillones, ostras y calamares; forma aproximadamente el 14% de las proteínas miofibrilares de estas especies. En animales acuáticos vertebrados cartilagosos, la paramiosina se encuentra en concentraciones de menos de 1% (Sano y col., 1986).

La actina comprende 20% del total de las proteínas contenidas en la miofibrilla, es la segunda proteína en orden de importancia después de la miosina. La actina es una proteína globular con peso molecular aproximadamente de 42 kDa, constituye el principal componente de los filamentos delgados. Connell y Howgate (1959, citado por Tsuchiya y col., 1977) realizaron los primeros estudios comparativos sobre la actina entre animales terrestres y acuáticos; estos autores demostraron que la actina del bacalao es similar a la del conejo, excepto por la presencia de una cantidad más elevada de residuos de prolina y menor de ácido aspártico, glutámico y lisina. Ambas actinas tienen un peso molecular muy similar a la actina de terrestres y acuáticos. La importancia bioquímica de la actina en el músculo vivo es en la conversión de energía química a mecánica, y en la transportación de una molécula de ATP, degradada por la miosina a ADP + Pi, proporcionando la energía necesaria para la contracción muscular (Carballo y López de Torre, 1991).

Las proteínas reguladoras promueven el inicio y terminación de la contracción (Carballo y López de la Torre, 1991); están clasificadas en reguladoras mayores y reguladoras menores. Las reguladoras mayores son la troponina y la tropomiosina. La troponina es una proteína globular que constituye del 8 al 10 % de la proteína total de la miofibrilla, tiene un peso molecular de alrededor de 78 kDa y comprende tres fracciones: troponina C, troponina I, y la troponina T, con un peso molecular aproximado de 18, 23 y 37 kDa respectivamente (Zhao y col., 1995). La

troponina T se une a la tropomiosina, mientras que la troponina C une a la troponina T con la I, caracterizándose por su capacidad de secuestrar iones de calcio (Putter y Gergely, 1975). La tropomiosina es una proteína de aproximadamente 68 kDa, constituye cerca del 5% del contenido total de proteína miofibrilar; está compuesta por dos cadenas polipeptídicas de aproximadamente 33 kDa cada una que se enrollan a lo largo de la miosina. La proporción de las dos subunidades varía con el tipo de fibra del músculo y especie. Entre los animales acuáticos y terrestres se ha observado variaciones en cuanto al peso molecular de esta proteína, del orden de 2 a 5 kDa. (Sano y col., 1989); su composición de aminoácidos es similar a la miosina, con ausencia de prolina y triptófano y bajo contenido de histidina. Las reguladoras menores son la α -actinina y las proteínas M, C, H, F, y la I; la función de algunas de estas proteínas es desconocida, pero se cree que forman una conexión entre los filamentos miofibrilares. La α -actinina se encuentra en la línea Z y su función es regular el ancho de los filamentos (Vigoreaux, 1994).

En la estructura del sarcómero se distinguen a los filamentos gruesos y a los filamentos delgados, se ha propuesto la existencia de filamentos longitudinales (T y S) que unen a ambos filamentos de un extremo a otro del sarcómero y están constituidos por las proteínas titina, desmina y nebulina (Robson y Huiatt, 1993) denominándose a estas proteínas de los filamentos intermediarios o proteínas intermediarias. La titina, anteriormente llamada conectina, es una proteína miofibrilar de aproximadamente 2800 kDa (Wang y col., 1979). Una molécula de titina atraviesa la mitad del ancho de un sarcómero, es decir desde la línea M hasta la línea Z, formando así un tercer filamento en la miofibrilla (Nave y col., 1989); ocupa el tercer lugar en abundancia de las proteínas miofibrilares y tiene un papel en la integridad de las miofibrillas (Maruyhama, y col., 1977). La desmina es una proteína de un peso molecular aproximadamente de 55 kDa, se ha reportado que está presente en las líneas Z del músculo, pero se ha encontrado además en los espacios intermiofibrilares (Tokuyasu y col., 1981; Vigoreaux, 1994) y en el músculo cardiaco de las células de los vertebrados; comprende un filamento de aproximadamente 10 nm de diámetro (O'Shea y col., 1981). La nebulina es una proteína que, al igual que la titina, fue descubierta por Wang y Williamson (1980); es de alto peso molecular que varía entre 600 y 900 kDa, se encuentra presente en el músculo estriado pero no en el cardiaco. El contenido de nebulina en el músculo es de alrededor del 3 al 4 % del total de la proteína miofibrilar.

2.2 Funcionalidad de las proteínas cárnicas: Emulsificación

La palabra proteína proviene del griego *proteois* que significa poner en primera clase, debido por el papel fundamental en la vida de microorganismos, animales y plantas. Las proteínas no solo tienen un papel importante en la vida, también lo tienen cuando son destinados a formar parte de la alimentación humana o animal. Las proteínas en la industria alimenticia son responsables en gran parte de las propiedades nutricionales por proveer los aminoácidos esenciales para el crecimiento y la manutención de la calidad de vida, además que imparten la base estructural de muchos alimentos debido a sus propiedades funcionales. Los sistemas alimenticios son generalmente heterogéneos con respecto a la composición y a los constituyentes que interaccionan entre sí, así como a la organización espacial y estructural de las moléculas que los componen. Las proteínas se encuentran en los alimentos como parte de los tejidos, o formando parte de sistemas físicos como en el caso de geles, emulsiones, y espumas. Las características de estos sistemas de dispersión dependen de la estructura química y física de los diferentes componentes.

2.2.1 Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales son las características físicas y químicas que determinan el comportamiento del sistema, en función a la interacción entre componentes o debido a un componente en particular, durante la producción, el almacenamiento y el consumo (Wilding y col., 1984; Kinsella, 1984; Kinsella y Whitehead, 1989). Las propiedades funcionales de las proteínas desempeñan un papel muy importante en los alimentos, tanto en los procesos de fabricación como en los atributos de la calidad del producto final (Flores y Bermell, 1985). Existen diferentes criterios de clasificación de las propiedades funcionales. Kinsella (1976) las clasificó de acuerdo a la función desempeñada en la elaboración de un sistema alimenticio (Tabla 2), mientras que Morrissey y col., (1987) las agruparon de acuerdo al tipo de interacción con otros medios (Tabla 3). Pour-El (1981) y Cheftel y col. (1989) las clasificaron de acuerdo a la interacción prioritaria de las proteínas que da como resultado la propiedad funcional (Tabla 4).

Tabla 2. Clasificación de las propiedades funcionales según Kinsella (1976)

Propiedad Funcional	Ejemplos
Ligantes	Ligar a lípidos, sabores, etc.
Organolépticas	Color, olor, aroma, etc.
Antioxidantes	Prevención de producción olores, sabores, etcétera
Enzimáticas	Coagulación
Reológicas	Viscosidad, gelificación etc.
Superficiales	Capacidad de formar una emulsión, espumante, etcétera
Hidratación	Solubilidad, viscosidad, etcétera
Estructurales	Elasticidad, cohesividad, etcétera

Tabla 3 Clasificación de las propiedades funcionales según Morrissey (1987)

Propiedad Funcional	Ejemplos
Hidratación	Capacidad de retención de agua, viscosidad, gelificación, solubilidad
Estructurales	Cohesión-adhesión, elasticidad
Ligantes	Con lípidos, aromas y sabores
Superficiales	Emulsificación, espumantes
Otras	Antioxidantes

Tabla 4 Clasificación de las propiedades funcionales
(Pour-El, 1981; Cheftel y col., 1989)

Propiedad Funcional	Ejemplos
Propiedades de interacción proteína-agua	Solubilidad, viscosidad, absorción y retención de agua, hinchamiento etc.
Propiedades de interacción proteína-proteína	Precipitación, gelificación
Propiedades de Superficie	Capacidad y estabilidad de emulsión y espumantes.

Van der Ven y col., (2002) clasificó las propiedades funcionales en dos grupos, de acuerdo al tipo de función que desempeñara la proteína, esto es tecnofuncional o biofuncional (Tabla 5).

Tabla 5 Clasificación de las propiedades funcionales según Van der Ven y col., (2002)

Propiedad Funcional	Tipo de propiedad	Ejemplos
Tecnofuncional	Solubilidad	Solubilidad Precipitación
	Reológicas	Espesante Gelificación Textura
	Surfactantes	Emulsificantes Espumantes
	Sensoriales	Sabores Aromas
Biofuncional	Nutricionales	Digestibilidad Actividad antimicrobiana

En las clasificaciones presentadas anteriormente, las propiedades no son independientes entre sí, y muchas de ellas se encuentran implicadas en otras de manera simultánea como es el caso de la solubilidad y viscosidad que dependen de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína. Existe controversia sobre si la actividad enzimática puede catalogarse como una propiedad funcional, como lo menciona Kinsella (1976). Sin embargo, lo que se puede asegurar es que la

actividad enzimática puede ser utilizada para modificar las características físicas y químicas de los componentes alimenticios y alterar el producto alimenticio terminado.

En la presente tesis se tomará la clasificación propuesta por Pour-El (1981) y Cheftel y col. (1989), debido a que las proteínas cárnicas, participan en tres tipos de interacciones: proteína-agua, proteína-proteína y proteína-grasa.

Factores que alteran las propiedades funcionales

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen de factores de tipo intrínsecos y extrínsecos (Kinsella, 1976; Smith, 1988). Entre los factores intrínsecos se encuentran las características químicas, físicas, estructurales y conformacionales, como la composición y la secuencia de aminoácidos; el tamaño, la forma y la distribución de la molécula; los enlaces con otras moléculas a través de grupos sulfhidrilo; y la hidrofobicidad superficial, entre otros. Los factores extrínsecos son los de tipo ambiental y de proceso; dentro de los primeros están el pH, la concentración y tipo de iones, la temperatura, la interacción con otros componentes, etcétera, mientras que entre los factores de proceso están el método de extracción de la proteína ya sea (calentamiento, congelación, refrigeración, secado, modificación química o enzimática), así como la manipulación durante el proceso de obtención de proteínas (Damodaran, 1996a).

La estructura de las proteínas es definitiva en las propiedades funcionales. Los grupos de una molécula de proteína en medio acuoso se comportan de diferentes formas; los grupos polares están orientados hacia la fase acuosa mientras que los no polares lo están hacia la parte interna de la molécula, dando como consecuencia la estabilidad de la conformación de la proteína por acción del agua. Sin embargo, si la proporción de aminoácidos no polares aumenta la estructura de la proteína se altera, ya que estos residuos se asocian y orientan hacia regiones hidrofóbicas formando nuevas estructuras, mientras que algunos aminoácidos quedan expuestos en la superficie molecular, dando como consecuencia “bolsas” hidrofóbicas que se protegen del medio polar a través de procesos de asociación (Kinsella, 1976).

Por tanto, también la composición de los aminoácidos es importante ya que los aminoácidos no polares causan cambios en las interacciones intermoleculares, tales como enlaces peptídicos, interacciones con agua y en la superficie (con aceite o aire) para formar emulsiones y espumas. Los aminoácidos cargados favorecen las interacciones electrostáticas, las cuales están implicadas en la estabilización de proteínas (Lins y col., 2003; Poon y col., 2001). El contenido de cisteína y cistina juega un papel importante en la estructura y función de la proteína ya que los grupos sulfhidrilo pueden ser oxidados a puentes disulfuro hacia el interior o hacia la superficie de la molécula (Genovese y col., 2000).

La estabilización de la proteína en su conformación ya sea terciaria y cuaternaria se debe básicamente a la estabilidad estructural de los residuos (Lins y col., 2003; Gómez-Moreno, 2003; Sancho, 2003). El rompimiento de las fuerzas moleculares entre aminoácidos y moléculas más pequeñas es la causa de la desestabilización de la proteína, la cual busca un “reacomodo” con los grupos existentes. Los enlaces moleculares encontrados en una proteína se resumen en la Tabla 6

Tabla 6. Fuerzas moleculares involucradas en la conformación de una proteína (Cheftel y col. 1989)

Tipo	Energía (kJ/mol)	Distancia (Å)	Grupos Funcionales
Covalente	330-380	1-2	Disulfuro
Puente de hidrógeno	8-40	2-3	amida, hidroxilo, grupos fenólicos
Interacciones hidrofóbicas	4-12	3-5	Cadenas alifáticas y aromáticas
Interacciones electrostáticas	42-84	2-3	Grupos amino y carboxilo
Fuerzas Van der Waals	de 1-9	2-3	Dipolos instantáneos

De las fuerzas señaladas en la tabla, las interacciones mas importantes son las hidrofóbicas ya que están relacionadas en el plegamiento de cadenas polipeptídicas y son los enlaces responsables

de la conformación molecular de las proteínas (Kinsella, 1976). Las interacciones hidrofóbicas han sido estudiadas en relación con las propiedades funcionales de diversas proteínas (Li-Chan y col., 1985).

A continuación se discuten las propiedades funcionales que se estudiaron en la presente tesis.

Interacciones proteína-agua: Propiedades de hidratación

Los principales parámetros responsables de las propiedades funcionales de las proteínas son el contenido de agua en el sistema y la capacidad de las proteínas de interactuar con la misma debido a que las proteínas solo presentan funcionalidad si se encuentran en fase acuosa (Chou y Morr, 1979). El tipo de enlaces involucrados en las interacciones proteína-agua son fundamentalmente puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo. Las interacciones proteína-agua promueven las propiedades de hidratación durante el proceso de producción de los alimentos, ya sea viscosidad, solubilidad, gelificación, o propiedades de superficie como emulsificación y espumado (Chou y Morr, 1979). Las principales propiedades de hidratación son solubilidad, retención de agua y viscosidad.

Solubilidad

Esta propiedad es la cantidad de proteína que se mantiene en solución bajo condiciones específicas y que no precipita a fuerzas centrifugas moderadas (Morrissey y col., 1987; Pilosof, 2000). La solubilidad de las proteínas depende de la composición de aminoácidos, la cuantificación de aminoácidos polares y no polares, así como la conformación de la proteína. Por otro lado esta condicionada por varios factores tales el pH, tipo de iones presentes y la concentración de estos (Kinsella, 1984; Morr y col., 1985). El conocimiento de la influencia de estos factores sobre la solubilidad es muy útil para seleccionar las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de sus fuentes originales, reflejando así resultados para la optimización de las condiciones de proceso.

Capacidad de retención de agua

Prácticamente existen dos conceptos que se relacionan con esta propiedad funcional. La capacidad de absorción de agua y la capacidad de ligar agua. La primera está definida como el agua absorbida por polvos proteicos a una humedad relativa (Franco y col., 1990), mientras que la segunda se refiere al agua retenida por una proteína después de la operación de filtración, o aplicarle una presión o fuerza centrífuga, como es en el caso de productos cárnicos (Trout, 1988). La capacidad de retención de agua varía en función del tipo de proteína, concentración, pH, fuerza iónica, temperatura y la presencia de otros componentes (p.e sales) (Chou y Morr, 1979).

Viscosidad

La viscosidad de las soluciones proteicas es una propiedad funcional cuya medida es utilizada frecuentemente como método para determinar el grado de desnaturalización y agregación proteica (Borderías y col., 1983). Es el cociente entre la fuerza de cizalla y la velocidad relativa de corte, por lo que es una forma de medir resistencia al flujo (Bourne, 1982). La viscosidad está determinada por el número y tipo de moléculas, así como por su arreglo en el medio; éste a la vez puede ser compuesto solamente por agua, contener disolvente y/o macromoléculas (Rha y Pradispenas, 1986; Cofrades y col., 1993). Algunos autores (Borderías y col., 1985; Huidobro y Tejada, 1993) han propuesto que existe una relación lineal entre la viscosidad y la concentración de las macromoléculas presentes, principalmente proteínas, esto es debido a la relación que existe entre la solubilidad de las partículas y la saturación de las mismas en el medio, así a menor concentración hay un descenso de la viscosidad, por otro lado a concentraciones grandes de proteína los valores de viscosidad aumentan debido a que predomina la interacción proteína-proteína (Kinsella, 1976; Rha y Pradispenas, 1986). También se ha observado que cuando existe desnaturalización de las proteínas miofibrilares se agregan dando como consecuencia una disminución de la solubilidad de estas, y por lo tanto una disminución en el valor de la viscosidad. Por otro lado, la carga electrostática de las proteínas en suspensiones también afecta a la viscosidad ya que en el punto isoeléctrico de la proteína no hay solubilidad y existe agregación. Aunado a esto, los valores de viscosidad están condicionados por el pH del medio. Cheftel y col. (1989) propusieron que la viscosidad de las suspensiones proteicas aumenta en medios alcalinos

debido a que las cargas eléctricas desenrollan a las moléculas ocupando un mayor radio hidrodinámico mientras que los valores de pI disminuyen. El efecto del pH sobre la viscosidad de soluciones proteicas depende de las características intrínsecas e individuales de la proteína en estudio. La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura debido al rompimiento de enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, dando como consecuencia la desestabilización de la proteína y la subsecuente agregación (Rha y Pradipasena, 1986).

Propiedades de superficie

Estas involucran a las interacciones de proteínas en interfases, donde una de estas es acuosa y la otra es aceite o aire. En el primer caso, donde las fases son agua y aceite se refiere a propiedades de emulsificación; en el segundo, cuando las fases son agua y aire se refiere a espumado. En ambos casos las proteínas en la interfase se distribuyen de forma que los residuos hidrofílicos o polares se orienten hacia la fase acuosa y mientras que los residuos hidrofóbicos hacia la fase de aceite o aire. Al igual que en otras propiedades funcionales, el comportamiento de las proteínas en la interfase está afectado por las interacciones físicas del medio, por la composición, por la conformación espacial de la proteína (Sainsby, 1986), y por la naturaleza de la otra fase (aceite o aire) (Huidobro, 1990). Las principales propiedades de superficie son: espumado, gelificación y emulsificación.

Espumado

La espuma es una dispersión de burbujas de aire en un líquido (Wagner, 2000; Damodaran, 2005). Esta propiedad involucra la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma. La primera evalúa el proceso de formación de una espuma por la proteína, es decir la habilidad de una proteína para incorporar aire en la solución en forma de una distribución fina de burbujas. La segunda propiedad evalúa el tiempo de vida de una espuma (Kato y col., 1985). Al igual que otras propiedades funcionales, el espumado depende de factores intrínsecos de la proteína como la hidrofobicidad total y superficial, la carga neta y superficial, la flexibilidad y conformación molecular, y la susceptibilidad al trabajo mecánico durante el proceso de formación de espuma

(Wagner, 2000). Los factores dependientes del medio que afectan a las propiedades espumantes de las proteínas son la concentración y solubilidad proteica, el pH, la concentración y tipo de sales.

Gelificación

La gelificación es la agregación de moléculas desnaturalizadas para la formación de una red proteica ordenada y tridimensional. El mecanismo y las interacciones que intervienen en la formación de la red no se conoce con detalle, sin embargo se supone se forma en dos etapas. La primera de desnaturalización y desdoblamiento de la proteína, y la segunda es la agregación de las moléculas parcialmente hidrolizadas, hasta la formación de la red proteica, la cual se propone que es el resultado del equilibrio de interacciones proteína-proteína, proteína-agua así como fuerzas de atracción y repulsión de las cercanas cadenas polipeptídicas (Cheftel y col., 1989).

Los parámetros que afectan la gelificación son la concentración y tipo de proteína, el pH, temperatura, fuerza iónica y la participación de otros componentes (Damodaran, 1989).

2.2.2 Emulsificación

Las emulsiones constituyen a un gran número de productos alimenticios, tales como la leche, la crema, la mantequilla, las bebidas no alcohólicas, las sopas instantáneas, las pastas, la mayonesa, los aderezos, las salsas y los helados, entre otros (Swaisgood, 1996; Damodaran, 2005). El estudio de las emulsiones es considerado multidisciplinario, ya que es combinada con disciplinas como la química, la física y la ingeniería (McClements, 1999a). En la industria alimentaria, el estudio de las emulsiones se enfoca principalmente a mejorar la calidad de proceso y de consumo de los alimentos emulsificados (McClements, 1999a).

Una emulsión es un sistema heterogéneo y meta estable, formado por dos fluidos inmiscibles, comúnmente en alimentos estos son agua y aceite. Una de las fases esta dispersa en la otra mediante partículas de tamaño coloidal en forma de gotas (Dimitrova y col., 2004; Damodaran, 2005). El sistema de emulsión es considerado una dispersión coloidal. El tamaño de partícula de una dispersión coloidal oscila en el intervalo 10nm-1mm (Walstra, 1996a) y las emulsiones alimenticias se encuentran en el rango de 0.1 a 100 μm (Eads, 1994; Robins y col., 2002). Las

emulsiones se clasifican de acuerdo a la composición de las fases dispersa y continua; un sistema el cual el aceite está disperso en una fase continua acuosa es llamado aceite en agua o emulsión O/W (por sus siglas en inglés) o aceite/agua, mientras que un sistema en el cual el agua está dispersa en una fase continua oleosa se denomina emulsión agua en aceite o W/O (por sus siglas en inglés) o agua/aceite (McClements, 1999a; Al-Malah y col., 2000).

Una emulsión se forma por diferentes formas, desde un paso hasta pasos consecutivos, dependiendo de la naturaleza de la materia prima y el método utilizado para la elaboración de esta. Lo mas conveniente es mezclar los ingredientes de acuerdo a su solubilidad, por ejemplo las vitaminas, colores y antioxidantes son mezclados en aceite, mientras que las proteínas, polisacáridos, azúcares y sales son mezclados con la fase acuosa. El tiempo de homogenización dependerá del número, distribución y homogeneidad de los materiales (Kinsella y Whitehead, 1989).

La formación de una emulsión se lleva a cabo mediante acción de un sistema mecánico a través de homogenizadores; los más usados en la industria de los alimentos son los molinos coloidales, de alta presión, ultrasónicos, de membrana, de métodos de micro fluidización y de alta velocidad. Estos dispositivos, desarrollados para producir emulsiones alimenticias, presentan ventajas y desventajas que dependen de la naturaleza de los materiales procesados, el volumen del material a homogenizar, la distribución del tamaño de partícula deseada, las propiedades fisicoquímicas requeridas del producto final, y el costo de operación y mantenimiento del equipo (Kinsella y Whitehead, 1989; McClements, 1999b).

El tipo de homogenizador empleado en la presente tesis fue el de alta velocidad. Este tipo de equipo es el más utilizado en la industria de alimentos, de tres tipos fundamentales: de paleta, de propela o de turbinas (Fellows, 1988). Los líquidos son homogenizados en un recipiente agitado por una hélice que rota a velocidades de 20 a 20,000 rpm, este movimiento rotatorio genera una combinación de velocidades longitudinal y rotacional, el tamaño de partícula producido es de un intervalo de 2 a 10 μm , dependiendo del tiempo y velocidad de homogenización (Fellows, 1988; McClements, 1999b).

2.2.2.1 Estabilidad de emulsiones

Debido a que una emulsión es un sistema meta estable, este cambia con el tiempo. Algunas emulsiones forman parte de intermediarios en el proceso de elaboración de productos alimentarios, por lo que solo necesitan estabilidad por unos pocos segundos, minutos u horas, mientras que otros son el producto final, por lo que la emulsión debe de ser estable por días, meses o años (Damodaran, 2005). La estabilidad de una emulsión es la habilidad que tiene una emulsión en resistir cambios en sus propiedades con respecto al tiempo. Una emulsión puede ser inestable por efecto de procesos físicos y químicos. La inestabilidad física es el resultado de la alteración en la distribución espacial o la organización estructural de las moléculas, mientras que la inestabilidad química se produce por una alteración en la estructura química de las moléculas. La inestabilidad física comprende fenómenos como el cremado, la floculación y la coalescencia (Walstra, 1996a; Dalgleish, 1997; Damodaran, 2005), mientras que la inestabilidad química se origina debido a cambios por oxidación o por hidrólisis de las moléculas, o ambos. (Walstra, 1996a). Ambos tipos de procesos de inestabilidad pueden ocurrir al mismo tiempo o secuenciado, o uno como efecto de otro (Walstra, 1996b).

Cremado

La fuerza generadora es la gravedad. En general, las fases de una emulsión tienen diferentes densidades, por lo que la fuerza gravitacional actúa sobre ellas a diferentes aceleraciones (McClements, 1999b). Si la fase dispersa tiene menor densidad que la fase continua, esta tenderá a migrar hacia arriba del recipiente que contenga a la emulsión, llamándose a este mecanismo cremado; si la fase dispersa tiene mayor densidad, migrará hacia el fondo, este fenómeno es de sedimentación (Walstra, 1996b). Generalmente las densidades de muchos aceites comestibles líquidos presentan una densidad más baja que la del agua, por lo que en una emulsión O/W hay una tendencia de que el aceite se acumule en la superficie (Dukhin y Sjoblom, 1996).

Floculación

Es un mecanismo en el que dos o más gotas forman agregados pero estas no pierden su integridad individual. La formación de flóculos puede ser una ventaja o una desventaja en la calidad de una emulsión, dependiendo de la naturaleza del producto alimenticio. La floculación acelera la velocidad gravitacional en emulsiones diluidas, lo cual es indeseable en un alimento debido a que reducen la vida del producto (Luyten y col., 1993). Este mecanismo también causa un aumento en la viscosidad de la emulsión y puede incluso formar un gel (Demetriades y col., 1997). Muchos productos son caracterizados por tener baja viscosidad y la floculación los demerita, sin embargo en otros productos una floculación controlada podría ser ventajosa debido a que promueve una textura deseada, si se controla el grado de formación, la estructura y la velocidad de formación del floculo.

Coalescencia

Por este mecanismo se juntan las gotas formando una sola, como consecuencia se pierde su integridad individual. El sistema adquiere un estado estable termodinámicamente debido a que decrece el área superficial entre las fases (Kavalnov y Wennerstrom, 1996). La coalescencia causa que las gotas de la emulsión cremen o sedimenten mas rápidamente por el incremento de su tamaño, como consecuencia de que la película interfacial se desintegre. En general la susceptibilidad de las gotas para coalescer es determinado por fuerzas que actúan entre las gotas, gravitacional, coloidal y mecánica (Walstra, 1996a; McClements, 1999b).

2.2.2.2. Propiedades de las emulsiones

Para que una emulsión sea estable a largo plazo, es necesaria la adición de un tercer componente que lo equilibre. Las proteínas, debido a su carácter anfifílico, juegan un papel importante en la estabilización de una emulsión. Las ventajas del uso de las proteínas como agentes emulsificantes se basa en que son compuestos naturales, en muchos casos no son tóxicas, son baratas y se encuentran ampliamente, características que las hacen buenos ingredientes en los alimentos (Wilde y col., 2004).

El mecanismo de adsorción de las proteínas a la interfase es diferente al de los surfactantes de bajo peso molecular. Estos surfactantes, debido a su bajo peso molecular, no presentan impedimentos estéricos conformacionales para la adsorción y orientación de la molécula, ya que los radicales hidrofílicos e hidrofóbicos se encuentran en los extremos de la molécula. Para las proteínas, en cambio, la adsorción y la orientación están limitadas por la distribución de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos dentro de la macromolécula, así como por su estructura tridimensional (Dimitrova y col., 2004).

A pesar de que todas las proteínas son anfifílicas, sus propiedades de superficie las hacen más o menos reactivas en sistemas aceite/agua. La flexibilidad de la cadena polipeptídica es resultado de la secuencia de residuos, la distribución de grupos R hidrófobos e hidrofílicos, la carga neta de la proteína, son algunos factores que determinan la capacidad emulsificante de las proteínas. La estabilidad de la emulsión se logra por la formación de una capa en la interfase aceite/agua con las proteínas (Dimitrova y col., 2004), en el cual la energía libre se reduce sí se incrementa la entropía. Lo anterior se logra por la interacción lípido/proteína, determinada por la hidrofobicidad del sistema (Morrissey y col., 1987; Damoradan y Song, 1988).

La formación de la película de proteínas se lleva a cabo en varias etapas; durante el proceso de homogenización de un sistema aceite/agua se produce una transferencia de masa, difundándose las proteínas hacia la interfase; una vez allí, estas se distribuyen a lo largo de la interfase a través de despegamientos y reorientación en la interfase; finalmente, las proteínas se adsorben en la interfase y se establecen interacciones intermoleculares entre las dos fases (Dickinson y Matsumura, 1991). La adsorción en la interfase, la etapa crítica que determina la estabilización de la emulsión, depende de la distribución de las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas en su superficie. Si la superficie de la proteína es extremadamente hidrófila y no contiene zonas hidrófobas, la adsorción es muy débil o no ocurre debido a que la energía libre es inferior en la fase acuosa que en la interfase o en la fase lipídica; a medida que aumenta en la superficie la cantidad de zonas hidrófobas la adsorción es más rápida (Damodaran, 1990 y 2005).

Las cadenas polipeptídicas en la interfase se configuran espacialmente en tres formas, dependiendo de las características conformacionales de la proteína: trenes, bucles y colas. La

primera configuración son segmentos que hacen contacto directo con la interfase, la segunda configuración son segmentos suspendidos en la fase acuosa, mientras que las colas son segmentos de grupos amino o carboxilo terminales de la proteína que se sitúan en la parte acuosa. La configuración de tren presenta uniones fuertes y menos tensión superficial que en las otras dos configuraciones (Damodaran, 1996b). Por otra parte, la resistencia mecánica de una película interfacial también depende de las interacciones intermoleculares: electrostáticas atractivas, covalentes (enlaces disulfuro), puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Dimitrova y col., 2004).

2.2.2.3 Caracterización de las propiedades de la emulsión

La caracterización de las propiedades de una emulsión, en general, se llevan a cabo en sistemas modelo, lo que permite estudiar el comportamiento funcional de las proteínas en forma precisa, ya que en sistemas reales la presencia e interacción de compuestos de muy variadas especies químicas produce errores de observación. Los experimentos modelo en emulsiones se dividen en dos grupos principales los métodos microscópicos y métodos macroscópicos. Los métodos microscópicos están diseñados para simular la interacción entre gotas, donde el objeto de estudio es la interacción entre gotas, o entre las gotas y la fase continua. Entre estos métodos se encuentran el uso de la celda de Scheludko, de aditamentos para medir las fuerzas superficiales en líquidos, de la celda de Mysels, de técnicas de encadenamiento magnético, etcétera. En el segundo grupo están los estudios en sistemas de emulsión modelo, como la estabilidad y la actividad de la emulsión, la distribución del tamaño de partícula y la viscosidad. Estos métodos reflejan un comportamiento global de la emulsión, se reflejan los efectos de la interacción de varios fenómenos intermoleculares (Dimitrova y col., 2004).

A continuación se describen los principios de los métodos experimentales empleados en la presente tesis, a través de los cuales se caracterizó la emulsión modelo, sujeto de estudio.

Capacidad de emulsificación

Es la cantidad de aceite que puede emulsionar una solución de proteína a una concentración dada al momento en que se produce la inversión de la emulsión. El principio de este método fue establecido por Swift y col. (1961) y en su forma más sencilla, consiste en la adición de aceite a un flujo constante a una dispersión de proteína que se mantiene en agitación continua, hasta que ocurre la ruptura de la emulsión. A partir de este método se han desarrollado estudios para detectar el punto de ruptura de la emulsión, entre ellos el cambio de viscosidad (métodos instrumentales y subjetivos) (Wang y Kinsella, 1976; Hauffman y col., 1975; Franco y col., 1990), el color (adicionando un colorante hidrosoluble) (Chiralt y col., 1998) o por conductividad eléctrica (cambios en la conductividad del sistema o de la potencia del homogenizador para mantener su velocidad angular constante) (Kato y col., 1985; Al-Malah y col., 2000; Bani-Jaber y col., 2000). Este último es el más utilizado, se basa en la medición de la conductividad eléctrica hasta la ruptura de la emulsión por medio de un voltímetro (Jiménez-Colmenero y García-Matamoros, 1981). Sin embargo, es importante que se considere al llevar a cabo este método que la capacidad de emulsión es dependiente de la velocidad de adición de aceite y de la geometría del homogenizador, además de que la posible incorporación de aire e incremento de la temperatura durante la homogenización y un aumento en la viscosidad de la emulsión lo cual dificulta medir el punto de ruptura de la emulsión (Wagner, 2000). La cantidad de aceite emulsificado se determina por diferencia entre pesos del vaso antes y después de la adición de aceite, o por el volumen agregado de aceite. Las condiciones de la determinación pueden ser modificadas para optimizar o adecuar el método según las necesidades particulares a estudiar.

Actividad de emulsión

Estima el área interfacial creada por el emulsificante. Existen varios métodos para determinar este parámetro: dispersión de la luz (Pearce y Kinsella, 1978), microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (Klemaszewski y col., 1989; Liboff y col., 1988), por conteo de partículas, entre otros. El método más utilizado para este fin es el propuesto por Pearce y Kinsella (1978), basado en turbidimetría, ya que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial. Estos autores definen la actividad de emulsión como el área

interfacial creada (medida en m^2) y estabilizada por una concentración dada de proteína (determinada en gramos) diluida 250 veces en un medio estabilizante. El índice de actividad de emulsión depende del volumen de la misma, el tipo de homogenizador empleado, la velocidad y duración de la homogenización, la concentración de proteína y la cantidad de aceite adicionado, por lo que debe tenerse cuidado en las condiciones experimentales, así como evitar la incorporación de aire, la formación de flóculos y el cremado durante las lecturas (Wagner, 2000).

Estabilidad de la emulsión

El estudio de la estabilidad de la emulsión consiste en analizar y cuantificar los cambios ocurridos en la emulsión, tales como pérdida de integridad del sistema por la separación de fases debido a los mecanismos de desestabilización en el sistema. Estos cambios se estudian mediante la medida volumétrica de la cantidad de cada una de las fases separadas de la emulsión por métodos granulométricos (tamaño de partícula), medidas ópticas y medidas turbidimétricas (Pearce y Kinsella, 1978; Shimizu y col., 1983; Latreille y Paquin 1990; Curt, 1994). El método turbidimétrico propuesto por Pearce y Kinsella (1978) es el más utilizado, se basa en medidas espectrofotométricas a lo largo de un intervalo dado de tiempo.

Distribución del tamaño de la partícula

Una partícula es una fase rodeada por otra fase, cuya dimensión máxima es menor a 1mm, pero superior al tamaño de intervalo coloidal de 10nm a 1mm (Walstra, 1996a y b). Frecuentemente el término partícula, es asociada a sólidos, como los encontrados en polvos y harinas, en alimentos también se consideran partículas a las gotas encontradas en una emulsión así como a las celdas de aire, cristales de hielo, entre otros (Aguilera, 2001). La distribución del tamaño de partícula se resume en un histograma de frecuencias del número de partículas en una dentro de un intervalo de tamaños. En la determinación de tamaño de partícula de una emulsión se pueden utilizar métodos microscópicos, y métodos de atenuación y disociación de luz (*scattering*), estos últimos aplican un programa de computadora para dar como resultado una distribución del tamaño de partícula (Brown, 1990; Aguilera, 2001, Coupland y McClements, 2001).

El análisis microscópico es adecuado para partículas de 1 y 100 μm , determinando la longitud en una dirección (diámetros) así como el área proyectada por las partículas. Cabe mencionar que de este método se derivan el análisis de imágenes con ayuda del programa de computadora especializado para caracterizar a las partículas. El análisis de imagen es una herramienta que permite extraer información de las imágenes analizando el arreglo bidimensional de píxeles, mediante el uso de filtros que mejoran las imágenes, reduciendo el ruido de las imágenes y enfatizando los bordes. Esto quiere decir que el análisis de imágenes puede contar el número de objetos en el campo visual, calcular áreas, medir distancia sobre objetos, caracterizar forma y establecer sus límites (Aguilera y Stanley, 1999; Aguilera, 2001; Quevedo y col., 2002).

El método de atenuación y disipación de luz (*scattering*), se basa en la interacción de un haz de luz láser al pasar a través de una suspensión de partículas; el análisis de las partículas es en el intervalo de 0.02 a 3500 μm . Se basa en el hecho de que el ángulo de difracción es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Es un método no destructivo ni invasivo, por lo que la muestra puede ser recuperada para una posterior evaluación (Aguilera, 2001).

2.2.3. Proteínas miofibrilares como emulsificantes

Las proteínas cárnicas que tienen mayor participación en relación con la funcionalidad en un alimento son las miofibrilares. Estas desarrollan un papel muy fundamental en la elaboración de productos cárnicos; debido a que presentan interacciones proteína-agua, superficiales y proteína-proteína son responsables de propiedades tales como retención de agua, emulsificación y la gelificación (Girald y col., 1991; Xiong, 2004). Las proteínas miofibrilares que más contribuyen a estas propiedades son la miosina y la actina, predominando esta última en la etapa *pre rigor*, y la actomiosina que predomina en la etapa *post rigor*. La miosina y la actina contribuyen con cerca del 95% en la retención de agua y entre un 75-90% en la emulsificación (Girald y col., 1991). Dependiendo de la formulación y el proceso de elaboración, las proteínas cárnicas presentan cambios e interacciones estructurales, desarrollando las características físicas específicas de un producto, en donde hay una combinación de propiedades funcionales.

Se han reportado diferencias en la funcionalidad de proteínas miofibrilares obtenidas de diferentes especies (Cofrades y col., 1996; Mittal, 2005). Aunado a esto, el tipo de tejido muscular del que proceden las proteínas, liso, estriado o cardíaco, determina la funcionalidad (Smith y Brekke, 1984). Esta diferencia se ha relacionado con el polimorfismo de la miosina, ya que las cadenas ligeras difieren en peso molecular tanto entre especies como dentro de una especie, en función del tipo del músculo (Smith, 1988). Asghar y col. (1985) por su parte, reportaron la presencia de isoformas como un indicador de la diferencia de funcionalidad de las proteínas miofibrilares; la miosina de pollo aislada de músculo blanco contiene tres isoformas, mientras que la de músculo cardíaco solo contiene dos (Nakai y Li-Chan, 1988).

2.2.3.1. Emulsiones cárnicas

Las especies animales empleadas para la elaboración de productos cárnicos son, mayormente, de res, cerdo, pollo y pescado, entre otras (Mittal, 2005). Entre estos productos procesados, tienen un lugar preponderante los finamente picados o emulsionados, como las salchichas tipo Viena y Frankfurt, la boloña, los pasteles (de pollo, de pimiento, etc.). Todos estos productos se clasifican como emulsiones cárnicas.

Una emulsión cárnica se define como una mezcla de proteínas musculares, grasa, agua, sal y otros ingredientes, que después del cocimiento resulta una mezcla homogénea con una estructura compleja en la que interactúan las materias primas (Jones, 1984). La estructura de estos productos se ha llamado pasta o emulsión cárnica del tipo aceite en agua, o O/W, donde las proteínas miofibrilares actúan como agentes emulsificantes fundamentales, si bien a nivel industrial se emplean otros emulsificantes y estabilizantes de la emulsión (Theno y Schmidt., 1978). Sin embargo, algunos autores (Hamann, 1988; Regenstein, 1988; Smith, 1988) consideran que no es una emulsión verdadera debido a que no es estrictamente un sistema donde la fase dispersa son glóbulos de grasa en una fase continua acuosa, además que los glóbulos de grasa de la fase dispersa son de diámetro mayor a 20 μm , límite máximo del tamaño de partícula de la fase dispersa para ser considerada como emulsión (Lee, 1985). La controversia ha llevado a realizar numerosas investigaciones para explicar el efecto fisicoquímico que ocurre en el sistema carne-aceite-agua. Brown y Toledo (1975) propusieron el término pasta cárnica (*meat batter*) en lugar de emulsión cárnica (*meat emulsion*), para evitar contradicciones. Shut (1976) propuso que el

término capacidad de ligar grasa es el más adecuado para describir la estabilidad del sistema cárnico. Esta controversia deriva de la explicación del mecanismo de estabilización; se han propuesto 2 teorías:

1. Teoría de la formación de emulsión
2. Teoría del atrapamiento físico.

En la primera teoría, el sistema cárnico es catalogado como una emulsión aceite en agua; se caracteriza por la formación de una película interfacial alrededor del glóbulo de la grasa (Gordon y Barbut, 1992b), mientras que la segunda teoría propone que los glóbulos de grasa son físicamente atrapados en una matriz proteica (Lee, 1985).

En la preparación de una emulsión cárnica se destacan tres propiedades de las proteínas (Acton y col., 1983): la interacción agua-proteína, la asociación lípido-proteína y la agregación proteína-proteína. Estas propiedades son las responsables de la capacidad de retención de agua, de emulsión y de la gelificación. Hermansson (1986) propuso una teoría intermediaria basada en la captura física de gotas de lípido en una matriz proteica, la cual depende del tipo de grasa, del tipo de músculo, y de las condiciones de proceso. Por su parte, Koolmes y col. (1989) sugieren que la estabilización del sistema cárnico se debe a la existencia de las dos teorías de formación del sistema cárnico.

En la presente tesis se elaboró una emulsión modelo a partir de proteínas miofibrilares, imitando la formulación de salchicha tipo Frankfurt, favoreciendo la primera teoría, de formación de emulsión más que de atrapamiento físico, como la base teórica de la metodología y discusión de los resultados.

2.2.3.2 Formación de una emulsión cárnica

Los primeros estudios en los que se muestra que las proteínas miofibrilares forman una película alrededor del glóbulo de grasa fueron reportados por Hansen (1960) y Swift y col. (1961).

Hansen (1960) sugirió que en un sistema cárnico emulsionado crudo las proteínas miofibrilares están orientadas y ordenadas hacia la superficie de los glóbulos de grasa, formando así una

membrana estable que no solo se encuentra en las pastas crudas sino también en las pastas cocidas, observándose además la presencia de poros pequeños (Borchet y col., 1967). La principal proteína involucrada en la formación de la película interfacial es la miosina (Swift y col., 1961; Galluzo y Regeinstein, 1978). Esta proteína, parcialmente desnaturizada, forma una capa monomolecular alrededor de los glóbulos de grasa, mientras que las otras proteínas se agrupan alrededor de esta monocapa. Para que la miosina forme una monocapa, debe de tener una región hidrofóbica que se orienta hacia el glóbulo de grasa, y una región hidrófila orientada hacia la fase acuosa y, por tanto, tener flexibilidad para desplegarse y adsorberse en la interfase (Jones, 1984). La molécula de la miosina esta orientada a la interfase con la cabeza de la meromiosina pesada (HMM) hacia la parte hidrofóbica, y la meromiosina ligera (LMM) dirigida a la fase acuosa (Jones, 1984). Lo anterior se comprueba debido a la alta hidrofobicidad de la meromiosina pesada (Borejdo, 1983; Harrington y Rodgers, 1984), por lo que la estabilidad de la emulsión cárnica se mantiene gracias a la repulsión electrostática entre moléculas de miosina con carga neta negativa (Kinsella, 1976).

Las proteínas miofibrilares involucradas en la formación de la película interfacial empiezan a desnaturizarse alrededor de los 43°C (Wright y Wilding, 1984). Sin embargo las pastas cárnicas son cocidas alrededor de 70°C, por lo que se esperaría que la grasa se expandiera. La realidad es que la película interfacial permanece en un estado semirígido debido a la formación de poros (Jones y Mandingo, 1982). En estudios por microscopia electrónica de barrido de la película interfacial se ha observado la presencia de pequeñas gotas de grasa alrededor de los poros formados por estos, concluyéndose que estos actúan como válvulas que regulan la presión producida por la expansión térmica de la grasa durante el cocimiento evitando que se destruya la película interfacial (Jones y Mandingo, 1982).

En estudios sobre la habilidad de las proteínas miofibrilares purificadas (miosina, actina, actomiosina y proteínas sarcoplásmicas) en la formación de emulsiones, se ha observado que la miosina tiene mejor capacidad de emulsificación, además de ser más estable que la actina, actomiosina y proteínas sarcoplásmicas (Hegarty y col., 1963; Tsai y col., 1972; Xiong y Kenney, 1999). Estos autores concluyeron que la causa de estas propiedades de formación y estabilización de las emulsiones es la forma molecular de la miosina, muy alargada y con una superficie

disponible considerable que rodea las gotas de grasa en una proporción 50 veces mayor a las otras proteínas miofibrilares.

Factores que afectan las propiedades emulsificantes de las proteínas cárnicas

Son varias las causas por las que las proteínas miofibrilares varían en su capacidad de emulsificación. El tipo del músculo es el primer criterio cuando se trata de elegir materia prima para elaborar emulsiones cárnicas (Hermansson, 1986; Swan y Boles, 2006). Swift y col., (1961) estudiaron la capacidad de emulsión de 13 diferentes cortes musculares de res y de cerdo, y encontraron que los cortes magros tenían una mejor capacidad de formación de emulsión que los cortes grasos. En relación a otros tipos de tejido muscular, se han estudiados músculo liso como cerebro, pulmón, estómago, intestinos (duodeno), hígado, riñón y bazo, además del corazón (Satterlee, 1975; Toledo, 1973). Las emulsiones realizadas con este tipo de tejidos fueron 60 a 70% más inestables que las formuladas con músculo estriado. También existe diferencia entre especies de diferente hábitat; Deng y col. (1981) realizaron estudios comparativos sobre la capacidad de ligar grasa y agua en pastas cárnicas en el músculo de bovino y los músculos dorsales de la caballa (*Scromber scrombus*) y concluyeron que las pastas formuladas con músculo de caballa eran más inestables.

Otros factores extrínsecos del proceso de formación de emulsiones también afectan a la capacidad de emulsificación de las proteínas miofibrilares, tales como pH, fuerza iónica del medio y concentración de la proteína y de la fase lipídica (Gordon y Barbut, 1992 a y b).

2.3 Enzimas, alterantes en sistemas cárnicos

Tanto en las especies de animales terrestres como las acuáticas, la estructura del músculo estriado cambia en la etapa *post mortem*, debido al proceso de resolución de la rigidez cadavérica y posteriormente de maduración. Durante esta etapa disminuye la dureza originada por la contracción muscular durante la rigidez, aumenta el pH y se producen compuestos de degradación que pueden contribuir positivamente al sabor de la carne, como es el caso de la maduración de la carne de res. Sin embargo, si se continúa el proceso de maduración por un tiempo prolongado se inicia la putrefacción. Estos procesos secuenciados, maduración y putrefacción, se originan por la presencia de enzimas endógenas de la célula muscular y de enzimas exógenas producidas por la microflora que ingresa a la carne por la manipulación de la canal. Ambos tipos de enzimas utilizan como sustrato a los compuestos químicos presentes en la carne. De principal importancia para esta tesis, es la utilización de las proteínas de la carne.

2.3.1 Enzimas proteolíticas

Las enzimas que hidrolizan a los enlaces peptídicos se conocen como peptidasas, peptidohidrolasas, proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas; sin embargo existen diferencias entre los significados de alguno de estos términos (Barrett, 1986). En 1962, la Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry catalogó a las proteinasas dentro del grupo E.C 3.4.; mientras que el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB, 1992), sugirió el término general de peptidasa para nombrar a todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos, aunque este término es poco usado en la literatura refiriéndose a enzimas proteolíticas como peptidasas. En la presente tesis se utilizó la nomenclatura adaptada por Barrett (1986), donde se emplea el término proteasa.

Las proteasas pueden ser exopeptidasas, las cuales actúan sobre los grupos amino o carboxilo terminal de aminoácidos, mientras que las endopeptidasas, también llamadas proteinasas (Macdonald y Barrett, 1986) actúan en los enlaces peptídicos internos de polipéptidos (Figura 3).

2.3.3.1 Clasificación de las endopeptidasas

Las proteasas (peptidasas) están clasificadas de acuerdo a los mecanismos catalíticos en los cuales actúan, cuyo nombre deriva del aminoácido existente en el sitio catalítico de la enzima. Hay cinco clases de endopeptidasas (proteinasas) reconocidas: serinproteasas, cisteinproteasas, aspartilproteasas, metaloproteasas (Webb, 1993) y las endopeptidasas de mecanismos desconocidos. (Figura 3).

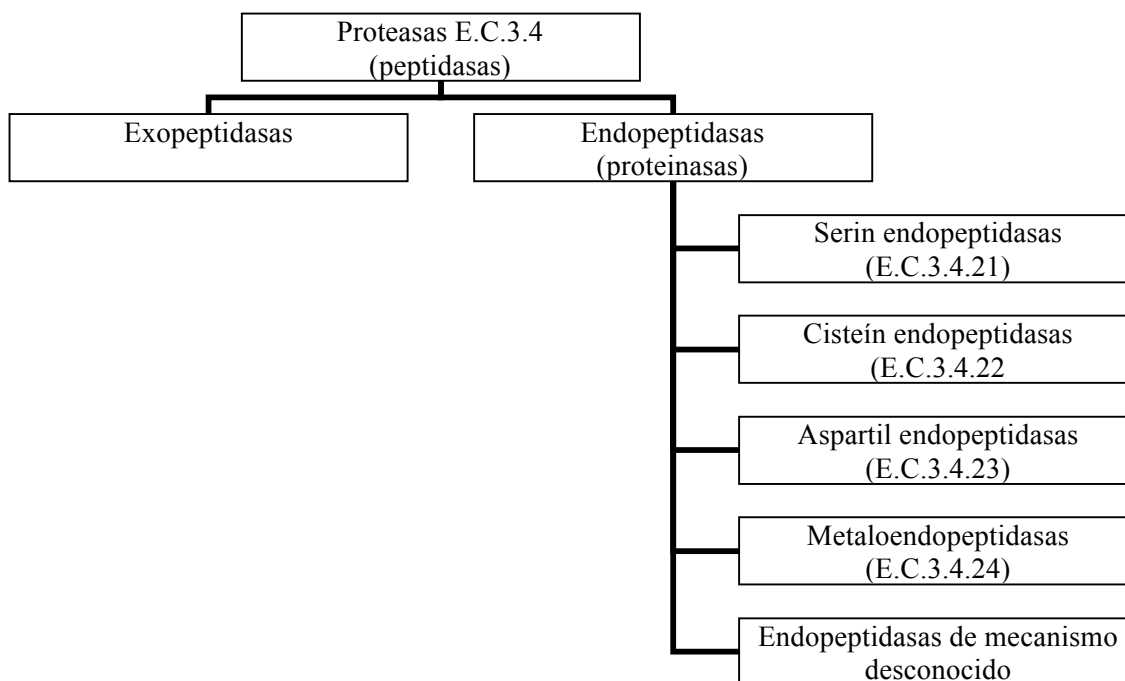


Figura 3. Principales clases de proteasas (peptidasas) de acuerdo a Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology NC-IUBMB, 1992 (Fan y Wu, 2005)

Serinproteasas

Esta clase comprende dos familias: de la quimotripsina la cual incluyen a enzimas de los mamíferos tales como quimotripsina, tripsina, y elastasa; y la de la subtilisina la cual incluyen a

enzimas bacterianas como la subtilisina. Las similitudes entre las dos familias están en el sitio catalítico, que comprende tres residuos de aminoácidos, His 57, Asp 102 y Ser 195, la misma geometría de sitio activo y la misma vía de catálisis, pero exhiben diferentes especificidades de sustrato. Los inhibidores de estas enzimas son de la familia de las serinproteasas y son las serpinas (Rawlings y col., 2004; Reeck y col., 1997).

Cisteinproteasas

Son también conocidas como de la familia de la papaína, ya que la homología entre ellas es cerca del 90% en su secuencia de aminoácidos, además que los residuos de aminoácidos en el sitio activo, Cys 25 y His 159, son los mismos que actúan en la catálisis. La mayoría de las enzimas proteolíticas lisosomales de los vertebrados e invertebrados, denominadas catepsinas, son de esta familia a excepción de la catepsina D, la cual es una aspartil proteasa. Otras enzimas catalogadas como cisteinproteasas son las encontradas en el citosol de la célula muscular, denominadas calpains. Los inhibidores de las cisteín proteasas son de la familia de las cistatinas (Reeck, 1997; Rawlings y col., 2004; Dubin, 2005; Fan y Wu, 2005)

Aspartilproteasas

Comprende a la familia de la pepsina, entre las que se encuentra la catepsina D, la renina, y la propia pepsina, también se encuentran en esta familia a algunas enzimas de origen fúngico, tales como la peniciliopepsina y rhizopuspepsina (Fan y Wu., 2005). Mares y col. (1989) encontraron, a través de estudios cristalográficos, que las moléculas de estas enzimas tienen 2 lóbulos homólogos y que el sitio activo se encuentra en la parte media de ambos. Cada lóbulo contribuye con un residuo de ácido aspártico, estos dos residuos comprenden el sitio catalítico de las aspartilproteasas.

Metaloproteasas

Esta clase de enzimas difieren ampliamente en su secuencia y estructura, pero la gran mayoría contienen un átomo de zinc catalíticamente activo, reemplazado en algunos casos por un átomo

de cobalto o níquel, sin perder actividad. La termolisina, una metaloproteasa, es una enzima bacteriana la cual ha sido caracterizada y su estructura cristalizada muestra que tiene un átomo de zinc que está enlazado con dos residuos de histidina y uno de ácido glutámico (Skiles y col., 2004).

De las cuatro familias de proteasas antes mencionadas, las que se encuentran en mayor proporción en un sistema muscular, ya sea vertebrados o invertebrados, terrestres o acuáticos, son las cisteinproteasas y aspartilproteasas. Las cisteinproteasas comprenden a las enzimas encontradas en el sistema lisosomal de la célula, denominadas catepsinas y en el citosol, llamadas calpains. Las aspartilproteasas comprenden algunas catepsinas, como la catepsina D, la cual presenta la mayor actividad en el sistema muscular y de las cuales se encuentran numerosos estudios en el almacenamiento de carne (Cheret y col., 2007; Polidori y col., 2001; McGrath., 1999; García-Barrientos, 1998.).

2.3.2. Proteasas endógenas de la carne

En el proceso de obtención de la carne como alimento, las proteasas juegan un papel fundamental al afectar las características de calidad (físicoquímica y sensorial). Estas proteasas son de tipo endógeno (lisosomales y citosólicas), encontradas inactivas naturalmente en el músculo vivo y activadas después de la muerte del animal; y exógenas, que ingresan al músculo por acción del metabolismo de algunos microorganismos de la flora nativa.

La acción de enzimas endógenas también afecta a los productos derivados de la carne. Cao y col. (1999) realizaron estudios sobre la familia de las serinproteasas y su acción sobre sustratos musculares en carpa; la alta actividad enzimática dio como resultado la alteración de la textura en los geles proteicos formados. En sistemas cárnicos, se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto de proteasas endógenas en sistemas cárnicos, con respecto al pH de actividad se dividen en enzimas ácidas o alcalinas (García-Barrientos, 1998; Sikorski y Kolakowska 2000).

2.3.2.1 Enzimas lisosomales: catepsinas

Antes de 1970 (McGrath, 1999) se sabía que los lisosomas poseían diversas enzimas capaces de degradar un número considerable de biomoléculas, y por tanto participaban en los procesos

fisiológicos de la célula, encontrándose así el primer sistema proteolítico intracelular que se relacionó con la actividad lisosomal y con la degradación de la célula; posteriormente se encontraron otras vías de degradación proteolítica extralisosomales. Los lisosomas son organelos citoplasmáticos contenedores de enzimas con actividad proteolítica ácida (Novikoff y Holtzman, 1978). Las enzimas de los lisosomas intervienen en la degradación de proteínas, polisacáridos y lípidos, y otros compuestos ya que los lisosomas están relacionados con la digestión intracelular (Melendo y col., 2001).

Después de la muerte del animal, las membranas lipoproteicas de los lisosomas se rompen al existir diferencias en la presión ejercida por los iones hidronio en el ambiente celular, por consiguiente las enzimas se liberan cuando desciende el pH; en este momento son capaces de degradar los componentes principales de la carne, dando como consecuencia la pérdida de uniformidad e integridad de la fibra muscular (Lawrie, 1998; Melendo y col., 2001).

El término de catepsina proviene del griego “digerir” y fue utilizado por primera vez por Willstätter y Bamann (1929), para describir una proteasa intracelular activa a pH ácidos. Las catepsinas, además de existir en animales acuáticos y terrestres, se encuentran en protozoarios (Bart y col., 1997), invertebrados terrestres (Caffrey y Rupel, 1997) y hongos (Sharma y col., 1989). En los animales superiores se encuentran en todo tipo de células a excepción de las células rojas de la sangre (Bond y Butler, 1987). Las catepsinas tienen un pH óptimo ácido (Anson, 1938; Lawrie, 1998; McGrath, 1999; Somoza y col., 2000).

Las catepsinas forman parte de la familia de las cisteinproteasas, aunque a este grupo se han incluido las catepsinas D y E, que son aspartilproteasas (Macdonald y Barret, 1986), la catepsina III que es una metaloproteasa (Henson y Frohne, 1976) y las catepsinas A (Macdonald y Barrett, 1986) y G, que son serinproteasas (Barrett, 1980). La inclusión de estas enzimas al grupo de las catepsinas se debe a que tienen actividad a pH ácidos. Muchos autores han relacionado a las catepsinas con la proteólisis encontrada en la carne, desde la obtención de la carne, almacenamiento, y proceso de producción de productos cárnicos. (Delbarre-Labrat y col., 2006; Herrera-Méndez y col., 2006).

Las cisteinproteasas tienen un 90% de homología en la secuencia de aminoácidos con la papaína, conociéndose también como enzimas de la familia de la papaína; tienen como papel principal hidrolizar los enlaces peptídicos utilizando los residuos de aminoácidos encontrados alrededor de su sitio activo cisteína (Cys 25) y una histidina (His 159) (McGrath, 1999).

Se han realizado estudios de aproximadamente 20 tipos de catepsinas de las cuales las catepsinas A, B, C, D, H, L, J, se han encontrado en los músculos de animales tanto acuáticos como terrestres siendo las catepsinas B, D, H y L las mejor caracterizadas (Matsumiya y col, 1989; Koohmaraie y col., 1990; Yamashita y Konagaya, 1991; Jiang y col., 1999; Hughes y col., 2000).

La Tabla 7 muestra las principales características *in vitro* de algunas catepsinas.

Tabla 7. Principales características de algunas catepsinas *in vitro*

Catepsina	Peso Molecular (kDa)	pI	pH	Acción	Sitio catalítico	Sustrato
B	25	4.5-5.5	4-6	endo	cistein	actina miosina actina miosina
D	42	5.5-6.5	3-5	endo	aspartin	troponina T troponina I línea Z
H	28	7.1	5.5-6.5	endo-exo	cistein	actina miosina actina miosina
L	24	5.8-6.1	4-6.5	endo	cistein	troponina T troponina I colágeno
M	30		5-7	endo		
S	25		6	endo		
T	35		6	endo		

Los estudios histoquímicos del tejido muscular han reportado la localización de las catepsinas, y explicado su participación en la degradación de las proteínas miofibrilares de la carne. Se ha encontrado que al cuarto día de almacenamiento de carne de bovino las catepsinas tienen una difusión máxima en la fibra muscular, lo que permite deducir que una vez degradada la

membrana lisosomal por el descenso de pH *post mortem*, la acción de las enzimas se incrementa con el tiempo de almacenamiento (Chambers y col., 1994). En los animales acuáticos la liberación de las catepsinas se ve favorecida además de la ruptura de los lisosomas por disminución del pH después de la muerte del animal (Church, 1998), y se ven involucrados factores de congelación y descongelación *post mortem* del músculo durante el almacenamiento (Skjervold, y col., 2001; Delbarre-Ladrat y col., 2006).

Sancho y col. (1997) reportaron que a 37°C es más intenso el rompimiento de las membranas lisosomales debido a que el músculo está en estado *post mortem*. En esta situación las enzimas proteolíticas son más activas a una temperatura óptima, causando una degradación extensiva de las proteínas miofibrilares. Estos autores encontraron que las catepsinas de bovino degradan a la miosina a 37°C pero no a temperaturas menores, mientras que la actina es degradada en pequeñas cantidades.

Las catepsinas del músculo del pescado se conocen desde hace un poco mas de 40 años (Siebert, 1962) pero continuamente han ido identificándose nuevas catepsinas en pescados y mariscos, en los cuales se ha reportado su efecto durante el almacenamiento, así como su purificación y uso en la elaboración de productos procesados (Yongsawatdigul y col., 1997; Hara y col., 1988; Jung y col., 2000). La catepsina L ha sido purificada de la merluza (*Merluccius merluccius*) y se ha caracterizado *in vitro*; se ha encontrado una actividad máxima a pH 5.5, y estabilidad hasta 55°C (An y col., 1994; Seymour y col., 1994). Cheret y col., (2007) estudiaron las catepsinas B, D, H, y L extraídas también de merluza, así como de bovino, encontrando mayor actividad en las catepsinas B y L de merluza que de bovino. Por otra parte la actividad de la catepsina D extraída de la carne de bovino fue 1.4 veces mayor que la encontrada en la merluza, mientras que la actividad de la catepsina H fue igual en ambos músculos.

2.3.2.2 *Enzimas citosólicas: calpainas*

Guroff (1964) reportó los primeros estudios sobre las calpainas demostrando la existencia de proteasas dependientes del calcio en cerebro de rata; posteriormente Meyer y col. (1964) las caracterizaron y más tarde fueron purificadas por Dayton y col. (1976).

El sistema proteolítico de las calpainas ha tenido varios nombres: factor activado por calcio (CAF), proteasas neutras activadas por calcio (CANP), cisteinproteasas dependientes de calcio, sulfhidrilproteasas dependientes de calcio (CDSP), y proteasas dependientes de calcio (CDP) (Haard, 1990; Kumamoto y col., 1992; Ilian y col., 2003). La clasificación de las calpainas por la International Union of Biochemistry es EC 3.4.22.17.

El sistema proteolítico de las calpainas se encuentra en el citoplasma del tejido muscular de los animales terrestres peces e invertebrados, consta de dos isoformas nombradas de acuerdo a la concentración de calcio que necesitan para activarse: μ -calpaina (1-5 mM) y m-calpaina (80-120 mM), también han sido llamadas calpaina I y II, respectivamente (Koohmaraie y col., 1988). Las calpainas del músculo esquelético (μ -calpaina y m-calpaina) tienen un peso molecular alrededor de 110 kDa, constan de dos fracciones de 80 y 30 kDa al analizarlas por electroforesis desnaturizante (Suzuki y Ohno, 1990).

Una de las características importantes de las calpainas es que son susceptibles al calcio que las induce, pero una exposición prolongada da como resultado la pérdida de actividad proteolítica y por último la destrucción de la enzima. Como resultado de la autoproteólisis, las subunidades de 80 y 30 kDa son degradadas a polipéptidos de pesos moleculares entre 76 y 18 kDa (Suzuki y Ohno, 1990; Saido y col., 1994a).

Morgan y col. (1993) encontraron que las concentraciones de calcio intracelular *in vivo* son suficientes para activar a la calpaina I pero no a la II, mientras que en condiciones *post mortem* la concentración de Ca^{2+} puede alcanzar concentraciones de hasta 0.1mM. En estudios sobre la degradación de las proteínas miofibrilares se ha observado que las calpainas producen proteólisis de la troponina T, troponina I, tropomiosina, α -actinina, titina, y nebulina (Zeece y col., 1983;

Koohmaraie,1992); la desmina también es extremadamente susceptible a la acción de las enzimas proteolíticas (Dayton y col., 1976). Sin embargo, las calpainas no degradan a la α -actina ni a la α -actinina (Goll y col., 1989), así como a la cabeza pesada de la miosina en animales terrestres (Tan y col., 1988). Las calpainas tienden a concentrarse en la línea Z por lo que la proteólisis empieza en este sitio, dando como resultado el desarreglo del sarcómero (Bird y col., 1980).

Las condiciones óptimas para la activación de las calpainas es a 25°C y pH 7.5, sin embargo el requerimiento mínimo de calcio para su activación es independiente de la temperatura (Cottin y col., 1991; Gil y col., 1998). La actividad de las calpainas se afecta por la presencia de grupos tiol, calcio, fosfolípidos (Saido y col., 1994b; Sorimachi y col., 1994) y por un inhibidor endógeno llamado calpastatina (Kawasaki y col., 1993; Croall y McGrody, 1994) el cual posee 4 dominios con una secuencia común de aminoácidos (TIPPEYR) que inhibe específicamente a la calpaina (Croall y McGrody, 1994).

El ablandamiento del músculo esquelético de animales terrestres ha sido ligado a la actividad *post mortem* del sistema proteolítico de las calpainas (Parr y col., 1999; Polidori y col., 2001). Cuando la carne es tratada con cloruro de calcio ocurre cierto grado de proteólisis, reduciendo así el tiempo necesario para la maduración *post mortem* (Cottin y col., 1991; Lee y col., 2000; Polidori y col., 2001). Sin embargo algunas propiedades sensoriales, tales como el olor y el sabor, se alteran (Lansdell y col., 1995). Los estudios en carne tratada con iones de Ca^{2+} , ya sea inyectada o marinada, han determinado que se genera un sabor residual amargo en carne de caballo y conejo (Pérez Chabela y col., 1998; Scanga y col., 2000). En cuanto a animales acuáticos, se han observado que las calpainas están asociadas con los cambios textuales de licuefacción en el músculo de crustáceos, induciendo una digestión inespecífica generalizada de las proteínas miofibrilares. Sin embargo, las calpainas del músculo de vertebrados son muy específicas, degradando principalmente a las proteínas troponina T, desmina, titina y nebulina, atacando tanto a la actina como a la miosina en vertebrados (Koohmaraie, 1992; Delbarre-Labrat y col., 2004). En músculo de pescado, las calpainas degradan a la miosina, específicamente a la cadena pesada, formando un fragmento de aproximadamente 150 kDa (Muramoto y col., 1988). Los mismos autores reportaron que las calpainas de pescado son mucho más activas a bajas temperaturas que las calpainas de mamíferos. La degradación proteica es específica de la especie acuática, además

de ser más activas contra las miosinas y menos estables al calor que en el caso de calpainas de animales terrestres. Las especies de peces de aguas frías son más susceptibles a la autólisis por calpainas que las especies de aguas tropicales. Aunque las calpainas han sido identificadas en especies tan diferentes entre sí como tilapia y camarón (Wang y col., 1993), carpa (Toyohara y Shimizu, 1988), atún, besugo rojo y trucha (Muramoto y col., 1988), todos los estudios reportan una relación entre la actividad de las calpainas y la textura de las muestras.

Delbarre-Labrat y col. (2004) aislaron la m-calpaina del músculo de róbalo y estudiaron la degradación de proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas, encontrando que esta enzima degrada componentes sarcoplásmicos a fracciones de 27 kDa, así como a la cadena pesada de la miosina, la α -actinina y la desmina.

Las calpainas y las catepsinas tienen una acción conjunta durante el almacenamiento *post mortem* de la carne; ambos sistemas proteolíticos ayudan a la degradación de la miofibrilla por medio de la degradación de las proteínas miofibrilares, dando como resultado la pérdida de la integridad y uniformidad de la fibra muscular (Masayuki y col., 1987; Etherington y col., 1987; Sikorski y Kolakowska 2000; Delbarre-Ladtrat y col., 2000; Jiang, 2000; Cheret y col., 2007; Herrera-Méndez y col., 2006).

Las enzimas endógenas de animales acuáticos, aunque similares a las encontradas en los animales terrestres, presentan algunas diferencias. En los animales terrestres, estas enzimas tienen un efecto benéfico al participar en el proceso de maduración de la carne, mientras que en los animales acuáticos aceleran los mecanismos de autólisis posteriores a la captura (Jiang, 1998; Jiang, 2000; Cheret y col., 2007). La velocidad de estos cambios depende de factores como el método de captura, la manipulación y el almacenamiento.

2.3.3 Enzimas exógenas

Las enzimas endógenas a las que se refiere la presente tesis son aquellas que pueden alterar la estructura de las proteínas miofibrilares en un sistema cárnico; son de origen vegetal, tales como papaína, bromelina y ficina, o de origen microbiano producto del metabolismo extracelular de la

flora nativa, inducida o adquirida por contaminación durante la manipulación de la carne. Entre la microflora proteolítica de la carne destaca el género de *Pseudomonas* (Gerelt y col., 2000).

2.3.3.1 Microorganismos productores de proteasas

La carne es considerada como un excelente medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos debido a su elevado contenido de humedad y de nutrientes. Los microorganismos que alteran a la carne llegan a esta principalmente por invasión *post mortem*, considerando que se trata de un animal sano.

Se han diseñado diversos métodos para la reducción de microorganismos contaminantes en la superficie de la carne, tales como aspersión con agua a presión a 35-80°C a 10 a 400 psi por 4-36 segundos (Guan y Hoover, 2005), aspersión con soluciones de cloro a concentraciones de 200 a 4000 ppm (Castillo y col., 1999; Bosilevac y col., 2004; Gill y Badoni, 2004); aspersión con ácido acético (1a 5%) o láctico (2-3%) (Dubal y col., 2004; Ramírez y col., 2001); pasteurización con vapor (Proceso SPS^{MR} de la compañía Frigoscandia^{MR}, Suecia) aplicando en un primer paso vapor saturado 8-10 segundos a 85-90°C y posteriormente aspersión con agua fría (Smith, 1996; James y col., 2000; Minihan y col., 2003); aspersión con fosfato trisódico (Oyarzabal, 2005; Pohlman y col., 2002); radiación ultravioleta (Wallner-Pendleton y col., 1994; Djenane y col., 2001); aplicación de ozono (Bosilevac y col., 2005; Castillo y col., 2003); fermentación láctica superficial (Minor-Perez y col., 2004); aplicación de bacteriocinas (Muthukumarasamy y col., 2003; Cutter y Siragusa, 2005); aplicación de lactoferrina activada (Naidu, 2000).

Sin embargo, todos estos métodos deben de estar seguidos de almacenamiento a temperaturas bajas, dando como resultado la reducción de la velocidad de reacción tanto química como microbiana. Durante la refrigeración, los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos degradan a la materia orgánica; los organismos psicrótrofos se reproducen a 0°C y crecen a 20-25°C, los psicrótrofos crecen en forma óptima a menos de 15°C (Margesin y Schinner, 1992).

Un número considerable de microorganismos psicrótrofos y psicrófilos provenientes de ambientes marinos y terrestres son productores de proteasas extracelulares. En este caso están los

géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Aeromonas*, *Aspergillus*, *Kluyveromyces* y *Pseudomonas* (Mackellar, 1982), algunos microorganismos de estos géneros son empleados como fuente de enzimas para la industria alimentaria como *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y *Kluyveromyces lactis*. La producción de enzimas extracelulares, desde el punto de vista tecnológico, tiene las siguientes ventajas:

- La molécula es segregada fuera de la célula, por lo que no se requieren técnicas de ruptura celular
- Hay una cantidad limitada de proteínas segregadas, por lo que es relativamente fácil aislar una enzima a partir de la mezcla
- Las proteínas extracelulares presentan una estructura más compacta y son menos susceptibles a la desnaturalización que las intracelulares

En la industria cárnica lo anterior presenta desventajas y pérdidas económicas debido a posibles contaminaciones con microorganismos psicrótrofos o psicrófilos productores de proteasas; las proteínas miofibrilares son más susceptibles al ataque proteolítico de las enzimas bacterianas, pudiendo llegar hasta la putrefacción.

La microflora que crece en carne fresca a temperaturas bajas ha sido revisada y reportada por varios autores, entre otros Kirsch y col. (1952) y Hamilton y Ahmad (1994). Los microorganismos que predominan y determinan los cambios a bajas temperaturas en carnes descompuestas son bacterias Gram-negativas de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Aeromonas* (Jay, 2000). Algunas bacterias de descomposición cuya actividad es determinante sobre las proteínas miofibrilares de la carne a temperaturas de refrigeración son: *Pseudomonas fragi* (Tarrant y col., 1971; Alanís-García, 1999), cepa P. MR 175 (Dainty y col., 1976), *Pseudomonas fluorescens* (Alanís-García, 1999), *L. mesenteroides*, *M luteus*, y *P. cerevisiae* (Borton y col., 1970). Entre otros estudios realizados, se han utilizado cepas aisladas de carne de bovino y su efecto sobre las proteínas miofibrilares mostrando mayor actividad proteolítica sobre las proteínas de bajo y alto peso molecular (Alanís-García, 1999). Otros estudios han reportado la producción de elastasa por pseudomonas (Ockerman y col.,

1969); dicha cepa también sintetiza una colagenasa extracelular con poder de hidrolizar residuos de hidroxiprolina (Greer, 1989).

Pseudomonas

Las bacterias del género *Pseudomonas* se agrupan en las bacterias Gram-negativas, pertenecen a los psicrótrofos, son aerobias con forma de bacilos, con pH de crecimiento no restringido en un intervalo de 5.5 a 7.0. Las *Pseudomonas sp.* predominan en la descomposición de la carne fresca y en otros alimentos frescos en refrigeración debido a su habilidad de crecer rápidamente a bajas temperaturas, así como a su competencia exitosa con otros microorganismos psicrótrofos (Hobbs y Hodgkiss, 1982; Patel y col., 1986; Rajmohan y col., 2002). Los microorganismos del género *Pseudomonas* son un grupo dominante de contaminantes activos de sustratos musculares de origen terrestre o marino (Jabbar y Joishy, 1999).

Los primeros estudios de contaminación de carne y la utilización de sustrato muscular por *Pseudomonas* fueron realizados por Beatty y Collins (1940) quienes observaron el deterioro del músculo de pescado y lo caracterizaron en 2 fases; en la primera se lleva a cabo la oxidación de ácido láctico, azúcares y otros carbohidratos, mientras que en la segunda fase ocurre un ataque de las proteínas y los aminoácidos. Inicialmente, *pseudomonas* utiliza a la glucosa sin generar subproductos de mal olor, cuando la población celular excede $10^8/\text{cm}^2$ la glucosa presente en la carne no es suficiente para sustentar los procesos metabólicos de estos microorganismos por lo que estos atacan a las proteínas y los aminoácidos, dando como consecuencia un aumento de pH debido a la acumulación de amoníaco producido por la desaminación de aminoácidos (Lea y col., 1969) y también a la formación de aminas biogénicas y sulfuros (Miller y col., 1973).

P. fluorescens es el psicrótrofo de descomposición de alimentos más estudiado, las proteasas producidas por este microorganismo son particularmente termoestables (Alanís-García 2003).

2.3.3.2 Proteasas de *Pseudomonas*

Las proteasas producidas por los *Pseudomonas* spp. son extracelulares; difieren por sus características bioquímicas. Se han encontrado proteasas con pesos moleculares que varían desde 20 a 50 kDa (Gebre-Egziabher y col., 1980), y caracterizado como de la familia de las metaloproteasas (Mitchell y col., 1986). El pH óptimo de actividad de estas proteasas es 6.5 a 8.3; la temperatura óptima de actividad tiene un intervalo de 30 a 45°C pero se ha observado que pueden tener actividad a temperatura de refrigeración en el intervalo de 1 a 8°C (Alford y Elliot, 1960). Peterson y Gunderson (1960) realizaron los primeros estudios sobre las proteasas de *P. fluorescens*, la enzima fue secretada en la fase logarítmica de crecimiento y la producción máxima ocurría a 0°C, pH 7.0 a 8.5. Otros autores que han estudiado la termoestabilidad de estas proteasas han sido Hurley y col. (1963) y Kinshonti y Sjöström (1970). Los factores que intervienen en la producción de proteasas son las fuentes de carbono y de nitrógeno, aunque se sabe que la producción de proteasas es debida a una regulación propia basada en la limitación de nutrientes (Harder, 1979).

Las varias especies de pseudomonas producen proteasas con características diferentes. Por ejemplo. *P. flourescens* AR11 secreta cuatro proteasas, la encontrada en mayor proporción ya ha sido purificada (Alichanidis y Andrews, 1977). Esta enzima es termoestable, con una actividad óptima a 35°C, mantiene 33% de actividad a 4°C; se inhibe por iones metálicos, por inhibidores de tripsina y quimiotripsina, y por EDTA. Se ha aislado también proteasas de *Pseudomonas* a partir de agua, las cuales secretaron cinco proteasas (Leinmuller y Christophersen, 1982); todas estas enzimas son activas a pH óptimo de 9; son estables a temperaturas altas y presentan inestabilidad a 50°C. Estas enzimas tienen un peso molecular de 39 a 48 kDa.

De la leche bronca se ha aislado *Pseudomonas* 28 P 12 la cual produce una sola enzima que hidroliza a la β -caseína más rápidamente que a la α -caseína (Milliere y Veillet-Poncet, 1979). Alanís-García (1999) reportó la actividad proteolítica de enzimas obtenidas a partir de 4 cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de carne de res, así como su efecto sobre las proteínas miofibrilares de la misma especie animal. De las cuatro cepas estudiadas en un sistema modelo, solo dos tuvieron actividad proteolítica alta sobre las proteínas miofibrilares, denominando a estas cepas como C-

61 y C-20. Además de estas cuatro cepas aisladas, reportaron la producción de enzimas por *P. fragi* y *P. fluorescens*, encontrando que *P. fragi* produjo dos proteasas, una de 49.2 kDa y otra de 34.2 kDa; *P. fluorescens* produjo una proteasa de 46.1 kDa, mientras que la cepa C-61, aislada de carne, produjo una proteasa muy activa de 46.8 kDa y la cepa C-20 una de 49.2 kDa. En una continuación de este estudio, Alanís-García (2003) reportó que la proteasa C-61 tenía un pH de actividad máxima entre 7.5 y 8, se clasificó como proteasa alcalina, con estabilidad en el intervalo de pH entre 3.6 y 10. La temperatura máxima de actividad fue 40°C, inactivándose a 50°C, con una recuperación parcial de actividad entre los 60 y 100°C. Se determinó la homología del gen ARNr 16S con secuencias de cepas tipo y la cepa C-61 aislada de carne de res, e indicó que pertenecía al género de *Pseudomonas*.

En la presente tesis se utilizó la cepa C-61, aislada de carne de res, semicaracterizada por Alanís-García (1999, 2003), para observar su efecto sobre un sustrato cárnico y la formación de una emulsión.

2.4 Alteración de sistemas cárnicos

En las distintas etapas del procesado y almacenamiento de los productos cárnicos ocurren alteraciones en los componentes del sistema: enzimáticas, microbiológicas y físicas. Estas se manifiestan en cambios macroscópicos que se reflejan en los atributos de calidad.

La ventaja en el uso de sistemas modelo es que el sistema se restringe a componentes fundamentales, muchas veces de alto grado de pureza, lo que permite estudiar los cambios sin el efecto inherente a un sistema real, muy completo. Los sistemas cárnicos, compuestos mayormente de proteínas y agua, se alteran como resultado principal de la modificación o de gradación de estas proteínas constitutivas, por lo que el seguimiento de estas modificaciones es un método para conocer el deterioro del sistema.

2.4.1 Alteraciones moleculares

Producción de radicales –SH

Las alteraciones moleculares de proteínas pueden determinarse mediante la cuantificación de grupos sulfhidrilos y por métodos electroforéticos en geles de poliacrilamida. Los grupos sulfhidrílos (SH) en la proteína se relacionan con los enlaces covalentes dentro de la misma, debido a la presencia de cisteína y cistina.

El contenido de cisteína puede ser determinado en una proteína nativa a través de la reacción del grupo SH, cuantificada espectrofotométricamente. Entre estos métodos, el más utilizado es el de Ellman. Este método consiste en la reacción de ácido disulfuro 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DNTB) (reactivo de Ellman) con los grupos SH, produciendo un tiofenolato de color amarillo intenso, que se determina a 412 nm (Ellman, 1959; Habeeb, 1972).

Desnaturalización proteica: electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación electroforética de proteínas miofibrilares en geles de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturizantes (SDS-PAGE) es ampliamente usado en el análisis cualitativo de la degradación de las proteínas. El extracto proteico es previamente tratado con agentes desnaturizantes, y posteriormente fraccionado de acuerdo al tamaño, peso molecular, carga y forma de las proteínas contenidas (García-Pérez, 2000; Torre, 1996). En algunos reportes la degradación de las proteínas es evaluada visualmente en los geles, sin el soporte de datos cuantitativos los cuales pueden ser determinados por el uso de densitómetros, o por análisis computarizados de imágenes. En el estudio de las proteínas miofibrilares, el objetivo de la electroforesis en gel de poliacrilamida es la identificación y la cuantificación de las proteínas y la visualización de los cambios en la composición (Claeys y col., 1995). La electroforesis en gel ha sido utilizada para estudiar las proteínas tanto de alto peso molecular, como la titina y la nebulina, como de las de pesos moleculares bajos (Granzier y Wang, 1993); los resultados del cambio en las proteínas se reflejan en la aparición de nuevas bandas de peso molecular bajo y desaparición de bandas de peso molecular alto.

2.4.2 Textura

La textura de los alimentos es un factor de aceptación o rechazo por parte del consumidor. Algunos autores relacionados con la ciencia de los materiales (Dobraszczyk y Vincent, 1999) ponen en duda el hecho de que la textura de un alimento pueda ser verdaderamente determinada mediante pruebas mecánicas, debido a la complejidad en su composición. Un material de naturaleza inorgánica tiene una conformación molecular estructurada por celdas definidas en el espacio intermolecular y de una misma especie; las pruebas mecánicas de estos materiales se llevan a cabo en las mismas condiciones en las que se someten al proceso para el cual se diseñaron o se produjeron. Por otro lado, los alimentos están formados de varias clases de moléculas, principalmente proteínas, lípidos, y carbohidratos, las cuales tienen características físicas diferentes durante el proceso de producción que los alteran en forma diferente. La temperatura es el factor que con mayor frecuencia influye en el comportamiento reológico y mecánico del alimento; por lo tanto, los métodos de medición se llevan a cabo a temperatura

constante. La temperatura en el interior del cuerpo humano es constante, aproximadamente de 37°C; sin embargo en la boca la temperatura es normalmente más baja. Cuando un alimento es introducido en la boca raramente mantiene la misma temperatura, produciendo un cambio en esta y, en consecuencia, en el comportamiento físico del alimento. Aunado a esto, la saliva forma una disolución con las moléculas del alimento. Otros factores que se deben tener en cuenta en la evaluación de la textura de los alimentos son la velocidad de masticación y la acción de la lengua ya que son indispensables en la percepción de la textura del alimento. En pruebas de laboratorio, estos factores son controlables pero poco posibles de ser correctamente imitados (Rosenthal, 1999; Roudot, 2003).

Scott-Blair (1958) clasificó las técnicas instrumentales usadas para medir la textura de los alimentos en tres tipos: a) pruebas empíricas, las cuales se llevan a cabo bajo condiciones bien definidas; b) pruebas imitativas, que simulan las condiciones del material en la boca; c) pruebas fundamentales o aparentes, las cuales miden parámetros como viscosidad o módulos dinámicos. Actualmente, los avances desarrollados en la instrumentación médica han sugerido una cuarta categoría de técnicas que examinan la neurofisiología de la experiencia al comer.

La textura está físicamente relacionada con los atributos mecánicos, geométricos y de superficie del producto, además de los materiales constituyentes, así como su distribución para dar forma al producto terminado. La textura de la carne no procesada es muy variable, depende de factores tales como la edad, el sexo y el manejo *ante mortem* del animal, el músculo y el manejo *post mortem*, y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el análisis (Sancho y col., 1997; Heinze y Bruggemann, 1994; Roudot, 2003). Tanto en la carne no procesada como en los productos cárnicos, la textura se ha relacionado con la estructura miofibrilar y el tejido conectivo (particularmente con las proteínas colágena, elastina y reticulina), además de otros ingredientes que forman un producto cárnico procesado que contribuyen a la formación de un sólido (Klettner, 1995; Pérez-Álvarez, 1996). En los productos cárnicos emulsionados las proteínas del tejido conectivo, o estromas, ayudan a dar firmeza al producto terminado debido a su reducción de tamaño durante el picado de la carne y a la desnaturalización que ocurre debido a métodos mecánicos y térmicos a las que son sometidas; la colágena gelifica a 60°C, lo que ayuda a estabilizar el sistema cárnico emulsionado (Seideman, 1986). En la fabricación de productos

cárnicos gelificados y semigelificados, la textura se altera debido a factores intrínsecos de la carne tales como la solubilidad de las proteínas miofibrilares, el grado de gelificación del colágeno y el contenido de grasa intramuscular, así como a factores que alteran al sistema, como disminución de pH, temperatura y la presencia de otros ingredientes (Seideman y Koohmaraie, 1987).

Los métodos instrumentales de medición de las propiedades mecánicas de la carne y productos cárnicos se clasifican en: procedimientos de corte, penetración, compresión y penetración; el más usado es la navaja de Warner-Bratzler (Warner-Bratzler, 1928; Roudot, 2003) que determina el esfuerzo al corte. Otro método muy usado es el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés), por el cual se obtienen varios parámetros que definen características del material analizado, como dureza, adhesividad, masticabilidad y cohesividad.

2.4.3 Ultraestructura

La microscopía en todas sus variantes, principalmente óptica, de barrido y de transmisión, ha sido una herramienta en el estudio de la organización estructural de los alimentos, y para establecer su comportamiento bajo condiciones de alteraciones físicas, enzimáticas, y microbiológicas. La microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) representa un avance reciente e importante en la investigación de la organización estructural de los alimentos; ha sido utilizada para revelar la superficie y los detalles extracelulares de los tejidos. A diferencia de otro tipo de microscopía, la SEM tiene como ventaja la observación de la muestra en forma tridimensional, la cual no es percibida por la microscopía de transmisión ni por la óptica, donde la visión es en dos planos. En la preparación de muestras para SEM, se aplican tratamientos para su fijación con gluteraldehído y tetraóxido de osmio (Hopwood, 1969; Hayat, 1970; Kiernan, 2000), deshidratación con etanol o acetona, y el secado bajo punto crítico de CO₂. Las muestras secadas son cubiertas con una capa de oro, platino y carbono que sirve como reflejante de los electrones emitidos por el cátodo (Anderson, 1951).

En el estudio de la carne, muchos trabajos han utilizado esta herramienta para observar las modificaciones microestructurales que tienen lugar durante la etapa *post mortem* y durante el almacenamiento, de las cuales derivan cambios macroscópicos que repercuten en la textura. Los

tejidos de animales analizados por SEM han sido dirigidos hacia la sangre, el músculo cardíaco, liso y estriado de diferentes especies (Sybers y Ashraf, 1973). Palka y Daun (1999) evaluaron el efecto del calentamiento de muestras de carne de bovino empacada al vacío sobre la ultraestructura. Por otro lado Ngapo y col. (1999a, 1999b) estudiaron el efecto de la congelación sobre la ultraestructura de la carne de cerdo encontrando diferencias. En productos cárnicos emulsionados se ha estudiado la interacción entre proteínas y grasa, fundamental en la estructura de las emulsiones cárnicas. Gordon y Barbut (1992a) estudiaron la ultraestructura de salchichas tipo Frankfurt por SEM y observaron la matriz de proteína que rodea a las gotas de grasa, concluyendo que las propiedades macroscópicas texturales y sensoriales dependen de la organización de estos elementos microestructurales, dando como consecuencia el interés de controlar las interacciones de los constituyentes del sistema.

En cuanto al estudio de productos cárnicos emulsionados, la SEM ha sido una herramienta poderosa para evaluar el efecto del procesamiento (Gordon y Barbut 1992a). Barbut (1989), Gordon y Barbut (1992a) utilizaron la SEM para observar el cambio en los glóbulos de grasa de pastas cárnicas cocidas a base de pollo en presencia de diferentes sales cloradas, y la variación en la concentración de grasa concluyendo que el control de esta cambian la estructura y textura de los productos finales (Barbut y Mittal, 1990). Esta herramienta también se ha utilizado para observar la modificación en la interacción de las proteínas en pastas cárnicas utilizando agentes químicos como peróxido de hidrógeno, β -mercaptoetanol, EDTA, urea y Tween 80, y su efecto en la textura de las pastas cocidas (Gordon y Barbut, 1992 a y b).

2.4.4 Microbiología de carnes y pescado

El músculo de animales sanos es considerado estéril en su parte interna; sin embargo después del sacrificio y durante el almacenamiento se observa desarrollo y crecimiento de microorganismos específicos, seleccionados naturalmente por la microecología de la carne, los cuales pueden ser patógenos o de descomposición (Rodríguez de la Cruz y col., 1996). La microbiología de los productos cárnicos es un parámetro importante de calidad debido a que la presencia de microorganismos específicos puede alterar significativamente la vida de anaquel de la carne, y afectar al proceso de fabricación de algunos productos cárnicos.

La carne es un excelente medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos, debido a su elevado porcentaje de humedad, pH próximo a la neutralidad y alto contenido de proteína. Los microorganismos que contaminan a la carne ingresan por infección del animal vivo (contaminación endógena) o por invasión *post mortem* (contaminación exógena). La contaminación endógena se inicia en las mucosas o en el tubo digestivo, o por enfermedad. La contaminación exógena se origina en las operaciones de matanza y limpieza, o durante la captura en el caso de animales acuáticos.

Las principales bacterias alterantes de la carne son Gram negativas tales como *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Alteromonas putrefaciens*, además de *Bochotrix thermosphacta* y algunas bacterias lácticas (Garriga y col., 1996). No solo se encuentran los microorganismos alterantes de la carne, sino que también microorganismos patógenos tales como *Campylobacter spp.*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, y *Listeria monocytogenes* (Nottingham, 1982).

En los animales marinos los patógenos más comunes son *Vibrio sp.* (Twedt, 1989; Anderson, 1991; Rice y Johnson, 1991), *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Aeromonas sp.* (Liston, 1992), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Gibson, 1992), así como toxinas producidas por dinoflagelados de los géneros de *Alexandrium*, *Gonyaulax* y *Protogonyaulax* (Hungerford, 1993), y parásitos (Olson, 1987). Los principales microorganismos alterantes presentes en pescado pertenecen al género de *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Moxarella* y *Acinetobacter* (Hobbs, 1991).

2.4.5. Formación de aminas biogénicas

Las aminas biogénicas son bases orgánicas de bajo peso molecular que se forman por la descarboxilación de aminoácidos, pueden considerarse como un indicador de descomposición de los alimentos (Bozkurt y Erkmen, 2004). Estos compuestos se encuentran presentes de manera natural en bajas concentraciones en ingredientes y/o alimentos no constituyendo un peligro; sin embargo en grandes cantidades son tóxicas (Shalaby, 1996; Vidal-Carou y col., 1990; Tamim y col., 2002) ya que a altas concentraciones causan cambios en la presión sanguínea, disminución

de la motilidad del intestino, disfuncionalidad respiratoria, diarrea, estimulación de la secreción de ácido gástrico y modificaciones de la capacidad vaso activa (González-De-Liano y col., 1998). Químicamente, las aminas biogénicas presentan una estructura alifática (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclica (histamina) (Kobahashy y col., 1992). Se forman por descarboxilación del aminoácido correspondiente: la tiramina procede de la tirosina, la histamina de la histidina, la cadaverina de la lisina, la triptamina del triptófano, la feniletilamina de la fenilalanina; la putrescina se origina por descarboxilación de la arginina y es un precursor de la espermina y espermidina (Vidal-Carou y col., 1990; Straton y col., 1991).

La formación de aminas biogénicas en los alimentos depende de las condiciones de almacenamiento, de la presencia de microorganismos descarboxilantes y de aminoácidos libres, de la calidad de la materia prima y de la manipulación de esta (Ansorena y col., 2002). Algunas bacterias tales como *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* poseen actividad descarboxilante (Halász y col., 1994).

Las aminas biogénicas se encuentran en la carne de pollo, cerdo, res, pescado y en productos derivados de estos (Eerola y col., 1993), como resultado de la actividad descaboxilante de algunos microorganismos durante la elaboración y almacenamiento (Bozkurt y Erkmén, 2004). En carne fresca, las concentraciones elevadas de putrescina, cadaverina y tiramina están relacionadas con poblaciones altas de *Pseudomonas sp.*, enterobacterias y bacterias lácticas, respectivamente (Guerrero-Legarreta y Chávez-Gallardo, 1991; Eerola y col., 1993; Hernández-Jover y col., 1997).

En la carne y productos cárnicos de especies acuáticas al igual que en especies terrestres la capacidad autolítica de descomposición por acción de enzimas proteolíticas digestivas, ocasiona que, en conjunto con la presencia de microorganismos descarboxilantes, la concentración de aminas biogénicas pueda alcanzar valores altos (Hierro y col., 1999; Ababouch y col., 1991; Halász y col., 1994).

Se han empleado varios métodos cromatográficos para la cuantificación de aminas biogénicas en alimentos, entre ellos gases (Staruszkiewicz y Bond, 1981), intercambio iónico (Zeece y col., 1983), capa fina y líquida (Naguib y col., 1995) y alta presión, la cual es la más empleada en la actualidad debido a su alta sensibilidad (Minocha y col., 1990; Ruiz-Campillas y Moral, 2001; Tamim y col., 2004).

2.4.6 Métodos de conservación de carne

Debido a los cambios que pueden ocurrir por la manipulación de carne, ya sea para consumo directo o como materia prima para la fabricación de productos procesados, se aplican varias metodologías para conservarla en condiciones óptimas.

El uso de métodos combinados de conservación durante el almacenamiento, como la refrigeración y el empacado al vacío, puede controlar la proliferación de microorganismos deteriorantes o patógenos, así como controlar la actividad enzimática. Sin embargo, algunas proteasas son activas a bajas temperaturas, como es el caso de las producidas por microorganismos psicrótrofos (Dainty y Mackey, 1992) y las proteasas endógenas de la carne (Wheeler y Koohmarie, 1994; Jiang y col., 1990), por lo que el uso de inhibidores es adecuado para controlarlas.

Refrigeración

Los procesos utilizados en la conservación de la carne y productos cárnicos pretenden evitar su alteración por microorganismos o enzimas, sin afectar su calidad organoléptica; así, la refrigeración ha sido muy empleada ya que satisface estos requisitos. Este es un método de conservación en el que el alimento está directa o indirectamente sometido a bajas temperaturas arriba del punto de congelación. El almacenamiento de carne en refrigeración generalmente se limita a períodos de tiempo cortos, debido a que los cambios en el alimento continúan, aumentando su velocidad con el tiempo (Haynes, 1993). La refrigeración favorece un ambiente selectivo en el que preferentemente crecen microorganismos psicrótrofos, que proliferan en forma óptima a más de 20°C, aunque pueden crecer a menos de 5°C, algunas cepas proliferan a

menos de 0°C (Gill, 1986; Brackett, 1992). Los principales factores que influyen la vida útil de la carne almacenada en refrigeración son: la carga microbiana inicial, las condiciones de temperatura y la humedad durante el almacenamiento, la especie del animal y los procesos combinados para aumentar la vida de anaquel (James y James, 2002).

Empacado al vacío

La extensión de la vida de anaquel de las carnes envasadas al vacío radica en los cambios que se producen en las concentraciones de O₂ y CO₂ dentro del envase, generándose una selección microbiana. El incremento en la vida útil de la carne envasada en atmósferas modificadas con altas concentraciones de CO₂ se debe a un cambio en la flora microbiana dominante con respecto a la envasada en aerobiosis (Minor-Pérez, 1998). El empaque al vacío es una forma de atmósfera modificada, debido a que se evacua completamente el aire al interior del paquete; este es el método más común por la industria cárnica para modificar el ambiente interno del envase. Se ha observado que en la carne empacada al vacío se alarga su vida de anaquel (Garriga y col., 1996).

En el empaque al vacío la microflora que originalmente se encontraba en la carne fresca se modifica en proporción y tipo. El crecimiento de *Pseudomonas* es inhibido, mientras que predominan algunas especies de *Lactobacillus* y *Brochothrix* (Nassos y col., 1983; Hotchkiss, 1988; Schoebitz y col., 1990; Greer y Jones, 1991). La carne empacada al vacío favorece la proliferación de la flora láctica, predominando los microorganismos del género *Lactobacillus*, aunque frecuentemente se encuentran otras bacterias lácticas como *Carnobacterium* y *Leuconostoc sp* (Dainty y Mackey, 1992). Shay y col. (1988) atribuyen a *Leuconostoc mesenteroides* el deterioro del color de la carne de res empacada al vacío.

Sin embargo, hay otros factores que favorecen o demeritan las ventajas del empaque al vacío. La carne con pH alto empacada al vacío se descompone rápidamente debido a la actividad de enterobacterias y microorganismos anaerobios facultativos como *Alteromonas putrefaciens* y *Brochothrix thermosphacta* (Gill y Penney, 1982).

Hood y Mead (1993) observaron que la efectividad del empaque al vacío es mayor a 5°C. En intervalos entre 5 y 12°C proliferan microorganismos patógenos tales como *Salmonella* sp., *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la actividad proteolítica endógena y exógena en la formación de una emulsión modelo formulada a partir de proteínas miofibrilares de carne de cazón (*Rhizoprionodon terranovae*) y de cerdo

3.2 Objetivos particulares

- Determinar los parámetros óptimos de actividad (pH y tiempo) de las enzimas endógenas de origen lisosomal y citosólico de la carne de cazón y cerdo.
- Obtener un extracto enzimático proteolítico a partir de *Pseudomonas fluorescens*, con el fin de ser añadido a la superficie de la carne de cazón y cerdo.
- Evaluar los cambios en la actividad proteolítica de las enzimas endógenas y la bacteriana durante el almacenamiento en refrigeración y temperatura de abuso de la carne de cazón y cerdo.
- Evaluar el efecto de las enzimas endógenas y la bacteriana sobre el cambio de algunos parámetros de la calidad de la carne de cazón y cerdo (pH, poblaciones de enterobacterias y psicrótrofos, y cuantificación de aminas biogénicas) durante el almacenamiento en refrigeración y temperatura de abuso.
- Conocer el efecto de las proteasas endógenas y la bacteriana sobre la modificación proteica con la cuantificación de grupos sulfhídrido y electroforesis desnaturizante en las proteínas miofibrilares, así como los cambios en las propiedades funcionales (viscosidad capacidad de emulsión, índice de actividad de emulsión y estabilidad de emulsión) de cazón y cerdo durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura de abuso
- Conocer el efecto de las proteasas endógenas y bacteriana sobre la distribución de las proteínas miofibrilares de cazón y cerdo en la interfase de una emulsión modelo.
- Evaluar el efecto de las enzimas endógenas y de la bacteriana sobre los cambios texturales de las emulsiones modelo gelificadas, así como la estructura mediante microscopia electrónica de barrido.

4. Justificación

La importancia de los productos cárnicos emulsionados es su bajo costo al consumidor, así como su rápida preparación. Una de las especies generalmente utilizadas en la elaboración de embutidos cocidos es el cerdo ya que las proteínas presentan una gran actividad superficial, sin embargo durante la elaboración de embutidos cocidos, la carne y pastas que son utilizadas no llevan un control cuidadoso con respecto a la temperatura de almacenamiento, además que muy pocas veces se tiene registro del tiempo después del proceso de *rigor mortis*, donde algunos parámetros considerados en la evaluación de la calidad de la carne, como es el caso de la cuantificación de poblaciones microbianas de organismos de descomposición y productores de metabolitos como las proteasas, que juntamente con las proteasas endógenas de la carne (catepsinas y calpainas) podrían alterar la integridad de las proteínas en aquellas que tienen actividad superficial durante la elaboración de embutidos, viéndose reflejado en la calidad de producto terminado y en la aceptabilidad del consumidor. Por lo que es necesario conocer el efecto que tienen las enzimas proteolíticas endógenas (catepsinas y calpainas) y la enzima producida por un microorganismo psicrótrofo (*Pseudomonas fluorescens*) sobre las proteínas miofibrilares de carne de cazón – la cual se sugiere como una alternativa en la elaboración de productos cárnicos emulsionados-, y de cerdo – utilizada como especie convencional en la elaboración de este tipo de productos- durante el almacenamiento en refrigeración y a temperatura de abuso (15°C) en la formación de un sistema cárnico modelo.

5. Materiales y Métodos

5.1. Obtención y almacenamiento de la carne de cazón y cerdo.

El cazón se obtuvo del mercado “la Viga” en México D.F., por lo que no se registraron las condiciones de captura, sexo, edad y tiempo de almacenamiento del animal. Se utilizaron los músculos dorsales del cazón desechándose la piel y los cartílagos.

Para el caso de cerdo se utilizaron muestras del músculo *Longissimus dorsi*, las cuales fueron obtenidas en un rastro del municipio de Ecatepec, Estado de México; los animales habían sido sacrificado 24 h antes de la toma de muestras, no se llevó registro de edad, sexo, ni condiciones *ante mortem* de los animales.

La manipulación de ambos tipos de carne fue por separado, y bajo condiciones asépticas e higiénicas.

Se cortaron en trozos de aproximadamente 3 cm por 10 cm, y se asignaron al azar a uno de los tratamientos.

Se empacaron al vacío en un equipo Multivac D-8941 (Koch, Kansas City) a -700 mBars, en bolsas Cryovac LB-50. El muestreo se llevó a cabo a los 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento para llevar a cabo los análisis correspondientes.

5.2. Estrategia experimental

Los tratamientos analizados en éste estudio fueron: el endógeno -denominado así por el efecto de las proteasas de la carne- (EE) y el exógeno -por el efecto de una enzima bacteriana producida por *Pseudomonas fluorescens*- (EB), estudiando en ambos casos el efecto de dos temperaturas de almacenamiento: 4 y 15 °C.

La EB utilizada en el tratamiento exógeno, fue producida y extraída a partir de *Pseudomonas fluorescens*, posteriormente la carne fue inmersa en un extracto enzimático de EB.

El trabajo experimental fue dividido en 4 estudios: A) Músculo estriado; B) Extracto proteico; C) Emulsiones modelo y D) Gelificación. Los parámetros analizados cada 5 días a las muestras expuestas bajo los tratamientos se explican a continuación.

Músculo estriado

Se tomaron muestras de carne de cazón y cerdo, se les realizaron los siguientes análisis: actividad enzimática, pH, poblaciones microbianas (psicrótrofos y enterobacterias) y concentración de aminas biogénicas (cadaverina, putrescina, triptamina y trimetilamina -sólo determinada en cazón-).

Extracto proteico

Se tomaron muestras de carne de cazón y cerdo para obtener los extractos de proteína miofibrilar, y de éste se realizaron los siguientes análisis: capacidad de emulsión, estabilidad de emulsión, viscosidad aparente, concentración de grupos sulfhídrido totales y modificación proteica por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Emulsión modelo

Los extractos de proteína miofibrilar obtenidos de cada especie además se utilizaron para formular emulsiones modelo aceite en agua (O/W) a las cuales se analizaron: tamaño de partícula, viscosidad aparente, distribución de proteínas en la interfase (proteínas adsorbidas y no adsorbidas en la interfase), y estructura del sistema por microscopía óptica.

Gelificación de emulsiones modelo

Las emulsiones modelo, se gelificaron por calentamiento. A éstas se les analizó la textura expresada como fuerza de penetración, y ultraestructura por microscopía de barrido electrónico.

Lo anterior queda resumido en la figura 4.

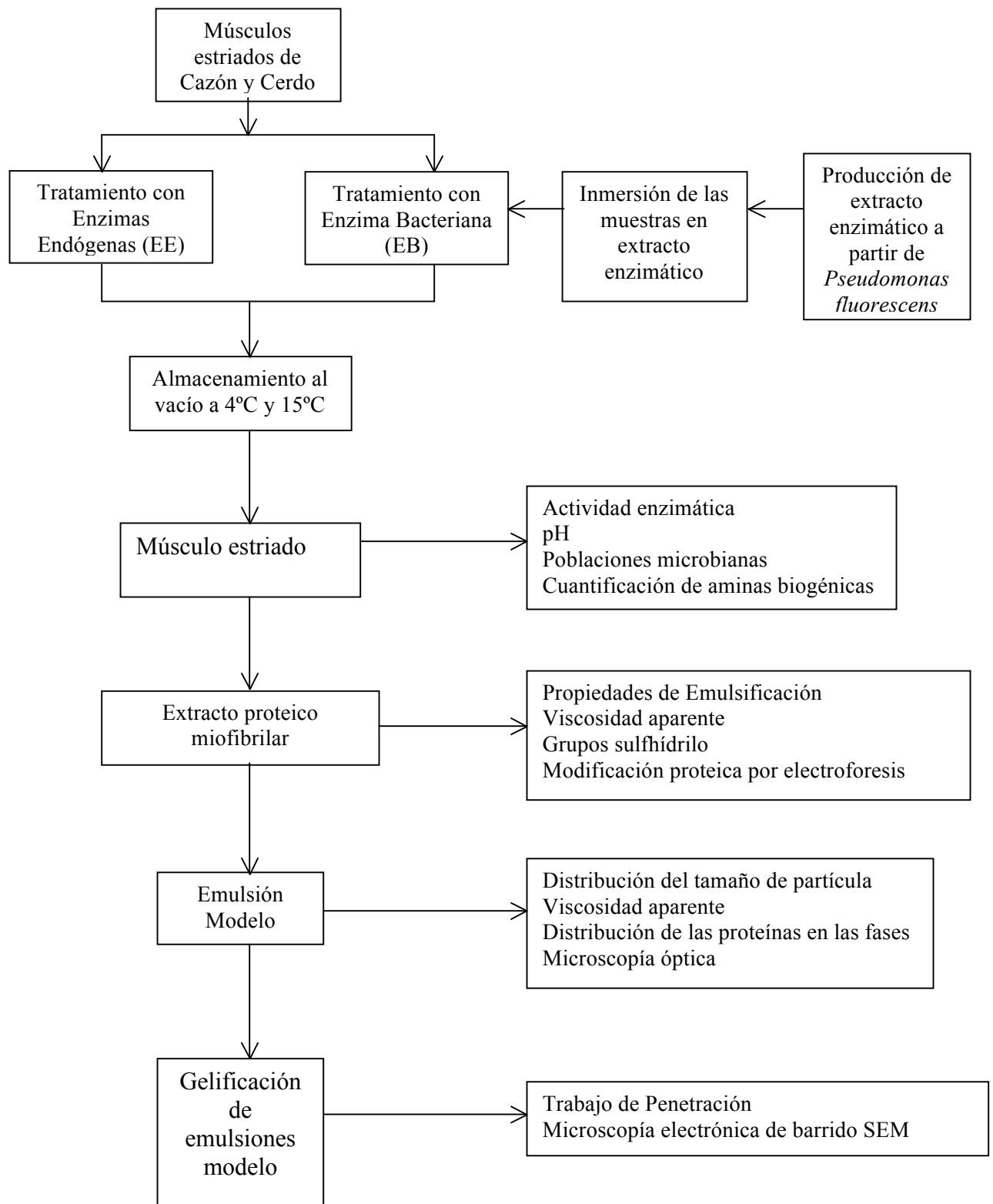


Figura 4. Estrategia experimental

5.3 Estudios preliminares

Antes de estudiar el objetivo principal de este proyecto, se realizaron estudios preliminares los cuales son importantes y necesarios para llevar a acabo la estrategia experimental. Éstos estudios consisten en la determinación de los parámetros de almacenamiento de la carne de cazón y cerdo (temperatura y tiempo), el análisis de los parámetros óptimos de la actividad proteolítica endógena de la carne de ambas especies (pH y tiempo) y la obtención de un extracto enzimático proteolítico a partir de *Pseudomonas fluorescens*.

5.3.1 Determinación de los parámetros de almacenamiento

Previamente al estudio, las muestras empacadas al vacío de cazón y cerdo, se analizaron temperaturas de almacenamiento con el fin de escoger una temperatura de abuso entre 10°C, 15°C, 20°C y 25°C durante 5, 10, 15, 20 y 25 días.

Las muestras de cazón y cerdo fueron obtenidas y manipuladas según los criterios señalados en la sección 5.1. De acuerdo a los resultados el almacenamiento a 4°C (temperatura de refrigeración) y 15°C (condiciones de abuso de temperatura) por un máximo de 15 días tuvo resultados suficientes para explicar los fenómenos encontrados en ésta tesis, se resume lo anterior para explicar el valor de las temperaturas que se aprecian en la estrategia experimental (Figura 4).

5.3.2 Actividad proteolítica endógena

Se analizó la actividad proteolítica para definir el pH y tiempo actividad máxima, debido a que no todas las enzimas encontradas en el músculo tienen los mismos parámetros actividad, aún dentro de los intervalos de pH ácido y básico varían el máximo de actividad debido a las características de la enzima como estructura, sitio activo, etc.

La actividad se analizó variando los tiempos de reacción y pH de los sustratos (hemoglobina y caseína). El tiempo de reacción se varió en un intervalo de 10 min a 60 min; el intervalo de pH se modificó de acuerdo al sustrato. En hemoglobina el pH se ajustó a valores ácidos (2, 3, 4, 5 y 6) (Anson, 1938), mientras que en caseína fue a valores neutros y básicos (7, 8 y 9) (Kunitz 1947). Se determinó la actividad proteolítica para cada uno de los valores de pH y tiempo aplicando los criterios señalados en la sección 5.4.1

5.3.3 Obtención del extracto enzimático a partir de *Pseudomonas fluorescens*

Se obtuvo a partir de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* aislada de carne de res, y conservada en el cepario del laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas de la UAM-Iztapalapa. Ésta enzima fue previamente estudiada y reportada por Alanís-García y col. (1999)

Activación de la cepa de *Pseudomonas fluorescens*

La cepa conservada con glicerol (1 mL), a -80°C se adicionó para su reactivación en un tubo de ensaye con 10 mL de medio TSB (caldo tripticaseína y soya) y se incubó a 25°C durante 24 h (Myhara y Skura, 1989). Una vez que se observó crecimiento, se tomó una alícuota de 1 mL y se adicionó en 9 mL de medio TSB. Esta operación se realizó por 3 generaciones más para así obtener cepas nuevas y lograr una mejor producción de la enzima. De la última generación se tomó una muestra y se sembró por estría en medio F (King., 1954), se incubó a 18°C por durante 24 h, después se observó la morfología en un microscopio óptico Olympus modelo CH 30 (Olympus Optical Co., Ltd Japón) a 40 aumentos después de llevar a cabo una tinción de Gram. Así, se observó que la cepa no estaba contaminada, con Gram positivas.

Actividad Proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* por placa agar-caseína

Con el fin de observar la acción de las proteasas producidas por *Pseudomonas fluorescens* en un medio agar-caseína, se aislaron colonias del medio sólido y se inocularon en cajas petri, las cuales contenían un medio cuya formulación era 1.2% de agar y 10% de leche en polvo como medio de caseína (Molin y Ternström, 1982; Gobbetti y col, 1998). Se incubaron 48 h a temperatura ambiente, después se pusieron por 2 h a 4°C para que el gel tuviera consistencia. La evaluación se determinó en base al diámetro del halo formado.

Propagación de cepa y obtención del extracto enzimático

Para obtener un cultivo de propagación se tomaron alícuotas de 1 mL de medio de la última generación, se adicionaron en 9 mL de medio TSB y se incubó a las mismas condiciones de activación de la cepa. Posteriormente cada alícuota se inoculó en matraces con 100 mL de medio TSB (Myhara y Skura, 1989) y se incubaron a 25°C por 24 h con agitación constante de 200 rpm.

Se prepararon 20 matraces con mamparas de 500 mL con 100 mL de medio TSB, se añadió 1 mL del inóculo de propagación que tenía una D.O. = 1.0 a 660 nm, leído en un espectrofotómetro Beckman DU-650. Los matraces se mantuvieron a una agitación constante de 70 rpm, por 48 h a $19\pm 1^\circ\text{C}$. Al término de éste tiempo se obtuvo un extracto crudo libre de células.

Obtención de extracto crudo libre de células

El extracto celular se separó por centrifugación utilizando una centrífuga Beckman J2-MI rotor JA-14 (Palo Alto, California) por dos veces a 8,000 rpm durante 30 min a 4°C , los precipitados se descartaron en ambos casos. Los sobrenadantes contenían la proteasa, la cuál fue precipitada con sulfato de amonio al 65% con agitación a 4°C ; se centrifugó a 8,000 rpm por 15 min, y el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de amortiguador Tris-HCl 50 mM, KCl 0.1 M a pH 7.5, 4°C , y se dializó por 24 h contra un amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.5. Finalmente se centrifugó a 8000 rpm por 30 min a 4°C , obteniéndose un extracto clarificado que contenía las proteasas.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad proteolítica de la enzima se analizó con algunas modificaciones del método descrito por Kunitz (1947). Se utilizó 1 mL de caseína con CaCl_2 2 mM en un amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.5 como sustrato, y 0.25 mL de extracto enzimático clarificado. El sustrato y el extracto enzimático se incubaron a 37°C por 1 h. La reacción se detuvo con 0.20 mL de ácido tricloroacético al 50%. Se centrifugaron las muestras a 2000 rpm, por 10 min en una microcentrífuga. La cantidad de caseína hidrolizada se obtuvo leyendo la mezcla de reacción a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650. La actividad enzimática fue reportada en $\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$

Determinación de actividad proteolítica y peso molecular por zonas bioactivas: SDS-PAGE.

El extracto enzimático obtenido se preparó para electroforesis en gel vertical, diluyendo 1:4 con el amortiguador muestra, sin β -mercaptoetanol. Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, California) y geles de tipo vertical. De acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles separadores con 12% de poliacrilamida.

Como referencia se aplicaron 2 marcadores, el primero, contenía 6 proteínas de peso molecular conocido: miosina 205 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa 97.4 kDa, albúmina bovina 66 kDa, albúmina de huevo 45 kDa (Bio-rad, 161-0303, California, EU); el segundo marcador fue tripsina, el cuál fue usado como control en la zona de actividad caseinolítica. Se realizaron los análisis electroforéticos inyectando 15 μ L de muestra y 10 μ L de marcador en cada carril. Se adicionó la solución de análisis (1.5%Tris base + 7.2% Glicina + 0.5% SDS + 600mL Agua desionizada a pH 8.3) dentro de la cámara. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: corriente de 15mA, voltaje de 200 V, y temperatura $4\pm 1^\circ\text{C}$ para evitar el efecto Joule; después del proceso de separación se sumergieron los geles por 30 min a 4°C en una solución de caseína al 2% en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 previamente enfriada; se almacenaron posteriormente por 2 h a 30°C con el fin de incrementar la actividad de la proteasa. Los geles se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron durante 2 h con azul de Coomassie R-250 al 0.1%; y posteriormente se destiñeron durante 1 h empleando una solución al 40% de metanol y 10% de ácido acético. Finalmente, los geles se leyeron en un analizador de imágenes Geldoc 2000 (Biorad, California, EU) para cuantificar los pesos moleculares de las bandas de las proteínas.

5.4 Músculo estriado de cazón y cerdo

Las muestras de cazón y cerdo, se separaron en dos tratamientos: endógeno (enzimas propias de la carne) y exógeno (enzima encontrada en la superficie de la carne por inmersión). En el tratamiento exógeno, las muestras de carne de ambas especies fueron inmersas en un extracto enzimático, durante 1 hr a 4°C , después se empacaron al vacío y se almacenaron a 4 y 15°C .

Cada cinco días a las muestras se les determinó: la actividad enzimática, el pH, cuenta total de poblaciones microbianas (psicrótros y enterobacterias) y cuantificación de aminos biogénicas, con el fin de obtener datos de los parámetros de calidad con los que contaba la carne en el momento de realizar la emulsión y observar el efecto de éstos sobre la formación de la emulsión modelo, y el estudio de la distribución de las proteínas en cada fase.

5.4.1 Actividad enzimática proteolítica

La determinación de la actividad proteolítica de la carne se clasificó de la siguiente manera: proteasas con pH de actividad ácida (catepsinas) y enzimas con pH de actividad básica y neutra

(calpainas) y enzima bacteriana (EB). Los sustratos utilizados fueron hemoglobina y caseína respectivamente (Anson, 1938; Kunitz, 1947).

Obtención de extracto enzimático

Se colocaron 10 g de carne en 20 mL de amortiguador de fosfatos de sodio 20mM, pH 7, a 4°C, se homogenizaron y posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm durante 30 min en una centrífuga Beckman modelo J2-MI (Palo Alto, California), con un rotor JA-14 se decantó el sobrenadante y se almacenó a 4°C hasta ser utilizado en la determinación de actividad proteolítica para así evitar la desnaturalización del extracto proteico.

Preparación de hemoglobina al 1%

El sustrato de hemoglobina se preparó de acuerdo a la técnica de Anson (1938). La hemoglobina se preparó en una solución de ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M y ácido acético 0.25 M, la mezcla se calentó y agitó en un baño maría por 20 min a 60°C posteriormente fue enfriado y almacenado a 4°C.

Preparación de caseína al 1%

Se preparó caseína al 1% de acuerdo a la técnica de Kunitz (1947) reportada por Yamaguchi y col., (1983) en un amortiguador de fosfatos 20 mM (fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico), calentándose a 60°C con agitación por 20 min, se enfrió y almacenó a 4°C.

Determinación de la actividad proteolítica

Se colocaron 0.25 mL (aproximadamente 1.37 mg de proteína) de extracto y 1 mL de sustrato correspondiente a el tipo de enzima a evaluar y se incubaron a 37°C. La reacción se detuvo con 0.2 mL de ácido tricloroacético al 50%, el cuál precipita tanto al sustrato sin degradar como a la enzima, mientras que los péptidos resultantes de la proteólisis se mantienen estables en la solución (Anson, 1938). La mezcla se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente, el precipitado fue eliminado por centrifugación a 2000 rpm, por 10 min en una microcentrífuga Sorvall MC-12C Dupont (Wilmington, Delaware), midiendo la absorbancia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, California). La actividad enzimática se reportó como unidades de actividad proteolítica. Una unidad de actividad

proteolítica se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 de densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 280 nm por minuto bajo las condiciones establecidas. (Yamaguchi y col., 1982).

5.4.2. pH

El valor de pH es utilizado como un factor en la calidad de la carne de cualquier especie, ya que de éste depende la conformación de las proteínas y a su vez las propiedades funcionales de la proteína. También del pH depende la formación de colonias de microorganismos alterantes y las subsecuentes reacciones que provocan éstos.

Se analizó por el método descrito por Guerrero-Legarreta y col. (2002), 10 g de muestra se homogenizaron en una licuadora convencional (Oster, Bartlesville, EUA) con 90 mL de agua destilada durante 1 min. El pH se midió en el sobrenadante con un potenciómetro digital Beckman (Beckman, Fullerton, California), previamente el electrodo se ajustó con dos amortiguadores de fosfatos de sodio y potasio de pH 4.0 y 7.0.

5.4.3 Poblaciones microbianas

A pesar de que todos los análisis realizados en ambas especies se hicieron bajo condiciones higiénicas, los análisis microbiológicos se realizaron con el fin de conocer la población de microorganismos psicrótrofos y enterobacterias totales presentes en las muestras debido a que pueden modificar la estructura proteica, y en consecuencia, los estudios sobre emulsiones formadas a partir de proteínas, además de ser indicadores de descomposición por la acción misma de su metabolismo y de la acción de los metabolitos que producen.

Cuantificación de poblaciones de psicrótrofos

En una licuadora convencional, se homogenizaron 10 g de carne con 90 mL de agua destilada estéril, se realizaron diluciones necesarias para el conteo adecuado en tubos de ensaye y agua destilada. Las diluciones se inocularon en cajas petri que contenían medio el medio para crecimiento de *Pseudomonas*, llamado medio F o medio King el cual consta de peptona de caseína + peptona de carne + MgSO₄, K₂HPO₄ + agar bacteriológico + glicerol y agua destilada (King y col., 1954), las cajas se se incubaron a 37°C durante 24 h.

Cuantificación de poblaciones de enterobacterias

Se tomaron 10 g de muestra, se mezclaron con 90 mL de agua destilada estéril en una licuadora convencional; se realizaron las diluciones necesarias para un conteo adecuado. Las diluciones se inocularon en cajas petri que contenían medio agar RVB (agar bilis y rojo violeta, Bioxon) (Grau, 1983). Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.

5.4.4. Concentración de aminas biogénicas

El análisis de la concentración de las aminas biogénicas se realizó como un índice de calidad de la carne de ambas especies. Ya que se ha observado que el género *Pseudomonas* produce putrescina y las enterobacterias forman cadaverina y triptamina (Haláz y col., 1994; Roig-Sagués y col., 1997; Enrola y col., 1993). La determinación de aminas biogénicas se realizó de acuerdo al método reportado por Hwang y col. (1997). Se determinaron cadaverina, putrescina y triptamina para ambas especies animales, y trimetilamina (TMA) se determinó únicamente en el cazón. Las curvas estándar de estas aminas fueron obtenidas con cadaverina dihidroclorada (17.14 mg), putrescina dihidroclorada (18.29 mg) triptamina (12.8 mg) y trimetilamina hidrociorada (12.67 mg). Los estándares se disolvieron en 1 mL de agua desionizada, obteniéndose una concentración de aminas libres de 10 mg/mL, posteriormente se derivatizaron.

Derivatización de los estándares

Se tomaron 50 µL de cada estándar (volumen final 0.2 mL), se adicionaron 1mL de NaOH 2M y 10 µL de cloruro de benzoílo, se mezclaron en un vortex y se dejó reposar por 20 min.

Posteriormente se adicionaron 2mL de solución de NaCl 5M, se extrajeron las amidas con 3 mL de eter etílico, la fase orgánica se evaporó a sequedad en un rotavapor Büchi 011 (Büchi, Flawil, Suiza). El residuo se disolvió en 500 µL de una solución metanol-agua 50:50 y se tomaron alícuotas de 50 µL para su análisis y obtener así curvas patrón de las aminas biogénicas.

Preparación de la muestra

Se homogenizaron 5 g de carne y 20 mL de ácido tricloroacético al 6% durante 1 min en una licuadora convencional, posteriormente se centrifugó el homogenizado a 4000 rpm a 4°C por 10

min; el sobrenadante se filtró en un papel filtro Whatman No.2. El filtrado se aforó a 25 mL con ácido tricloroacético al 6%.

Derivatización de las muestras

Se homogenizaron 2 mL del filtrado de la muestra con 10 μ L de cloruro de benzoilo y 1 mL de NaOH al 2 M; se dejó reposar durante 40 min a 30°C, la reacción se detuvo con 2 mL de NaCl 5M. Las amidas resultantes fueron extraídas con 3 mL de éter etílico agitando suavemente, la fase orgánica se evaporó a sequedad en un rotavapor; el residuo se disolvió en 500 μ L de metanol grado HPLC, y se filtró a través de membranas de 0.45 μ m.

Condiciones del análisis HPLC

Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Waters (Waters, Milford, E.U.), equipado con un bomba 626, detector de arreglo de diodos UV-VIS 994 y software Millennium 2.1v. Se utilizó una columna de fase reversa Symmetry C18 (Waters) de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y un tamaño de poro de 5 μ m. Se inyectaron 50 μ l de muestra y estándares. La fase móvil tuvo un flujo de 0.3 mL / min. Los gradientes de elución se presentan en la tabla 8. El cromatograma se obtuvo a una longitud de onda de 254 nm.

Tabla 8. Gradientes de metanol empleados en la elución del análisis de aminas biogénicas

Tiempo (min)	Metanol 100%	Metanol 55%
0	100	0
10	100	0
15	44	56
28	44	56
33	0	100
39	0	100
40	100	0
41	100	0

5.5. Extracto proteico

A las muestras de carne de ambas especies almacenadas a 4 y 15 °C, cada cinco días se les realizó una extracción de proteínas miofibrilares, con el fin de observar, las propiedades de

emulsificación (capacidad de emulsión), viscosidad aparente, y análisis moleculares (grupos sulfhidrilo y modificación proteica por medio de electroforesis).

5.5.1 Extracción de las proteínas miofibrilares

Se extrajeron las proteínas miofibrilares de cazón y cerdo mediante una modificación de la técnica reportada por Ngapo y col. (1992). La carne se homogenizó con agua y hielo en las mismas proporciones, se mantuvo en agitación durante 10 min en baño de hielo y posteriormente se eliminó el tejido conectivo mediante un tela de manta de cielo. Se añadieron 100 mL de agua fría y se agitó nuevamente durante 15 min, el homogenizado se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se suspendió en un amortiguador 50mM de fosfatos de sodio pH 7 y NaCl 0.6 M, en ésta fracción estaban contenidas las proteínas miofibrilares.

La concentración proteica en el extracto se determinó por el método de biuret (Gornall y col., 1949) el cual es un método colorimétrico que se basa en la formación de un complejo colorido cobre-proteína en condiciones alcalinas y que es cuantificado mediante espectrofotometría de luz visible a 540 nm. Los datos obtenidos se interpolaron con una curva patrón de albúmina bovina con una concentración máxima de 10 mg/mL (Anexo I).

5.5.2 Propiedades de emulsificación

Capacidad de formación de emulsión

Se determinó por medio de conductividad eléctrica descrito por Totosaus (1996), el cual se basa en registrar el volumen máximo de aceite emulsificado antes de la ruptura de la emulsión determinado por cambio en conductividad eléctrica. Se utilizó un tubo de acrílico con dos alambres de cobre en el fondo como electrodos, se elaboró una emulsión aceite en agua (O/W) adicionando 10 mL de aceite de maíz y posteriormente 5 mL de una solución de proteína miofibrilar de 5 mg/mL; se mezcló con un homogenizador M133 (Biospec Products, Bartlesville, E.U.A) durante 5 seg dentro de un baño de hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas. Inmediatamente con ayuda de una bureta se adicionó aceite de maíz, con un flujo de 1 mL/seg, registrando la resistencia con un multímetro Sanwa (Sanwa Electronic, Japón) hasta que la

corriente fue interrumpida. Los resultados se reportaron como el volumen expresado en mL de aceite por 100 mg de proteína.

Índice de actividad de emulsión

Se utilizó el método descrito por Pearce y Kinsella (1978) modificado por Li-Chan y col., (1984). Se tomaron 3 ml de una solución de proteínas miofibrilares que contenían 5mg/ml de proteína y se homogenizaron durante 1 min, con 1 mL de aceite de maíz, una vez formada la emulsión se tomó una alícuota y se diluyó 200 veces con una solución de 0.3% de SDS y se agitó, se determinó la absorbancia a 500 nm. El índice de actividad de emulsión total que refleja la capacidad global de emulsionar el sistema miofibrilar se determinó mediante la ecuación 1, se expreso en m²/g:

$$\text{IAE} = \frac{(2) (2.303) (200) (\text{ABS})}{(\emptyset) (P) (10000)} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Ø: Fracción volumétrica del aceite

P: concentración de proteína

ABS: absorbancia determinada a 500

Estabilidad de la emulsión

Se utilizó el método descrito por Pearce y Kinsella (1978) modificado por Li-Chan y col. (1985) el cual se basa en el reposo a temperatura ambiente de una emulsión preparada hasta coalescer o flocular.

Se preparó una emulsión O/W con 3 ml de una solución de proteínas miofibrilares que contenían 5 mg/ml de proteína y se homogenizaron durante 1 min, con 1 mL de aceite de maíz, una vez formada la emulsión se tomó una alícuota y se diluyó 200 veces con SDS al 0.3%, se agitó y se midió la absorbancia a 500 nm. Se tomaron lecturas a diferentes tiempos y así obtener una cinética. La estabilidad se determinó por el tiempo que tarda en disminuir a la mitad la absorbancia de la emulsión inicialmente formada.

5.5.3 Viscosidad aparente

Se determinó en el extracto de proteínas miofibrilares extraídas según descrito en la sección 5.5.1 La viscosidad aparente de las muestras de cazón y cerdo, se midió a 25°C, con un viscosímetro Brookfield DV-I con agujas LV (Stoughton, Massachusetts), a una velocidad de deformación de 0.3 rpm, la aguja utilizada estuvo en función de las características de la muestra.

5.5.4 Análisis moleculares

La información que reflejan estos análisis radica en la conformación de las proteínas por efecto del tratamiento, ya que una modificación en las moléculas se vio reflejada en los grupos expuestos y en la desnaturalización de las mismas por la formación de cadenas de péptidos de bajo peso molecular.

Concentración de grupos sulfhidrilo totales

Se determinó por el método descrito por Cofrades (1994), haciendo reaccionar al ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DNTB o reactivo de Ellman) con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, obteniendo nitrofenilato libre con una absorción máxima a 412 nm. En 1 mL de solución proteica de 5 mg/mL se adicionaron 9 mL de urea 8M en Tris-Gly-EDTA, se dejó reposar por 30 min; después se tomaron 3 mL de la mezcla de reacción y se añadieron 50 µmL de reactivo de Ellman; se dejó reaccionar por 30 min y se midió la absorbancia a 412 nm. La concentración de grupos sulfhidrilo se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ moles } -\text{SH} / \text{mg proteína} = \frac{(75.53)(\text{absorbancia})(10)}{5} \quad \text{Ecuación 2}$$

Modificación proteica

Con el fin de estudiar la modificación de las proteínas sujetas a las condiciones experimentales, se analizó el extracto proteico por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), para observar el cambio en pesos moleculares.

Electroforesis de proteínas miofibrilares

Se realizó por el método descrito por Laemmli (1970), utilizando geles de tipo vertical con 12% de poliacrilamida utilizando una cámara de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, California). Las muestras de extracto de proteína miofibrilar con una 5 mg/mL fueron tratadas con el amortiguador muestra (solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% + mercaptoetanol al 5% + azul de bromofenol al 0.05%+ glicerol 10%, 0.5M Tris-HCl pH 6.8) y se calentaron en un baño maría a 97°C durante 2 minutos, antes de su aplicación.

Como referencia se aplicó un marcador que contenían 6 proteínas de peso molecular conocido miosina 205 kDa, β -galactosidasa 116 kDa, fosforilasa b 97.4 kDa, albúmina bovina 66 kDa, albúmina de huevo 45 kDa, anhidrasa carbónica 29 kDa (Sigma, C3312).

Se puso el amortiguador (Tris base 1.5%, glicina 0.7%, SDS 0.5%) dentro de la cámara y se conectó a una fuente de poder con un voltaje de 200 y una temperatura de 4+1°C, para evitar así el efecto Joule generado durante el proceso.

Una vez terminado el proceso de separación los geles se tiñeron empleando una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol 40% y ácido acético al 10% durante 30 min y posteriormente se destiñó empleando una solución al 40% de metanol y 10% de ácido acético. La imagen de los geles se analizó en un autoanalizador de imágenes Geldoc 2000 (Biorad, California) para cuantificar los pesos moleculares de las bandas de las proteínas (Claeys y col., 1995).

5.6. Formulación de la emulsión modelo

Las emulsiones se prepararon con una solución del extracto de proteínas miofibrilares de cada especie, con aproximadamente 20 mg de proteína. La formulación final de la emulsión contenía las proporciones de una salchicha en porcentaje de ingredientes carne/agua/grasa, siendo éstos en la emulsión modelo 50% proteínas miofibrilares, 35% de amortiguador de fosfatos, pH 7, y 15% de aceite de maíz. Las fracciones se homogenizaron a 13,000 rpm por 3 min a 4°C, en un homogenizador M 133 (Biospec Products, Bartlesville, EUA); para evitar la desnaturalización de las proteínas. A estas emulsiones se les determinó la distribución del tamaño de partícula, la

viscosidad aparente, la distribución de proteínas en las fases (adsorbidas y no adsorbidas) y el análisis del sistema por microscopía óptica.

Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó con respecto al tiempo de emulsificación para determinar las condiciones en que se obtenían tamaños homogéneos en las emulsiones de ambas especies estudiadas. Se empleó un equipo Malvern Mastersizer, Serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra) aplicando un modelo log normal (MacClements, 1999a).

5.6.1 Viscosidad aparente

Este parámetro se determinó con el fin de observar la interacción de proteína-grasa por efecto de los tratamientos utilizados respecto al tiempo de almacenamiento.

Se llevó a cabo en las emulsiones modelo formuladas con 50% proteínas miofibrilares, 35% de amortiguador de fosfatos, pH 7, y 15% de aceite de maíz, mediante el uso de un viscosímetro Brookfield, aplicando la técnica descrita en la sección 5.5.3.

5.6.2 Distribución de proteínas en las fases (adsorbidas y no adsorbidas)

Se realizaron emulsiones modelo O/W con proporciones de 50% proteínas miofibrilares, 35% de amortiguador de fosfatos, pH 7, y 15% de aceite de maíz (Apartado 5.6).

Se rompieron realizando unas modificaciones del método descrito por Yamauchi y col. (1980), utilizando centrifugación a 3000 rpm, durante 5 min a 4°C. Los resultados de ésta fueron 3 fases; una acuosa, la cual representa a las proteínas no adsorbidas; una cremosa que representa a las proteínas adsorbidas y una fase de oleosa. Se removieron las fases acuosa y de aceite por aspiración, teniendo cuidado de no mezclar las fases separadas. La fase oleosa se descartó. A la fase acuosa se le determinó el contenido de proteína por el método de biuret (Gornall y col., 1949) (Anexo I), y se tomó 1 mL muestra para el subsecuente análisis en electroforesis.

La fase de crema se diluyó 3 veces con amortiguador de fosfatos, pH 7, a 40°C se mezcló y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 min, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, dando como resultado dos fases, una acuosa y otra cremosa, se descartó la acuosa. A éste proceso de dilución-

centrifugación se le denominó “lavado”. Se realizaron 5 lavados de cada muestra. La fase cremosa lavada, tiene una interacción proteína-aceite por lo que la proteína adsorbida en el glóbulo de grasa de la fase dispersa, obtenida por los lavados, se extrajo por la adición de 3 mL de una solución de SDS al 4% y mercaptoetanol al 0.5%, se calentó a ebullición durante 3 min, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C; la proteína adsorbida se encontró en la fase acuosa obtenida después de la centrifugación. De esta fase se tomaron muestras para el análisis en electroforesis. Dado que la concentración total de proteína en la emulsión se conoce, y por medio del método descrito se conoce la cantidad de proteína adsorbida, mediante un balance de masa se determinó el contenido de proteína encontrado en cada fase (Pearce y Kinsella, 1978). Las modificaciones ocurridas en las proteínas adsorbidas y no adsorbidas en las fases de la emulsión se analizaron por electroforesis, por la metodología descrita en la sección 5.5.4.

5.6.3. Microscopía óptica

La estructura de las emulsiones se evaluó por microscopía óptica, observando el tamaño del glóbulo formado. Se utilizó un microscopio Olympus modelo CH 30 (Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Las emulsiones, formuladas como se describe en la sección 5.6., se diluyeron 1:100. Se tomó una gota con una pipeta Pasteur, se colocó en un portaobjetos, se colocó en el microscopio y se observó en magnificaciones de 10x y 40x.

5.7 Formación de geles a partir de las emulsiones modelo

Se tomaron 20 mL de la emulsión formada con los extractos de proteínas miofibrilares y se colocaron en recipientes de 20 mm de diámetro por 50 mm de largo y se calentó gradualmente a 1°C/min hasta 80°C, punto en que se formó un gel. Estos se almacenaron a 4°C durante 24 h. Se les determinó un análisis textural (penetración), y se analizó la estructura de las emulsiones gelificadas por microscopía de barrido de electrones.

5.7.1 Análisis textural: penetración

El análisis de textura se llevaron a cabo por penetración en geles producidos por calentamiento de las emulsiones, se utilizó un analizador de textura, TA-XT2 (Texture Technologies., Scarsdale,

Nueva York) con un programa Texture Expert v1.2 (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra). Los análisis evaluaron la resistencia a la penetración de 50% de la altura de los geles, a temperatura ambiente. El equipo se calibró con una celda de 45 N, se utilizó una geometría cilíndrica de acrílico de 10 mm de diámetro, la velocidad de la prueba se realizó a 1 mm/seg.

5.7.2. Microscopía de barrido de electrones (SEM)

La ultraestructura de los geles formados a partir de las emulsiones se evaluó por microscopía de barrido electrónico. Los geles se prepararon de acuerdo a los métodos descritos en la sección 5.6. y 5.7; de éstos se cortaron pequeños trozos con un área aproximada de 5 mm², los cortes se realizaron longitudinalmente y firmes, con navajas de un solo filo con respaldo, evitando mover la navaja durante el corte para evitar protuberancias en la muestra.

Una vez realizado los cortes de la muestra, se pusieron en contacto superficial con una solución de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, con glutaraldehído al 5%; hasta que éstos tuvieran un color naranja-amarillento. Posteriormente se colocaron en viales de 2.5 mL que contenían solución de glutaraldehído al 5%; se almacenaron por 24 h a 4±1°C; se realizaron lavados de los cortes con amortiguador de fosfatos, pH 7.4 (un lavado rápido y dos cambios de 15 min) hasta quedar eliminado el olor a glutaraldehído. Después de éstos lavados, los cortes se sumergieron en una solución de tetraóxido de osmio durante 2 h, después se realizaron 2 lavados de 20 min con etanol en cada una de las concentraciones de 30 a 90% y etanol absoluto.

A continuación las muestras se colocaron en microcápsulas de tipo poroso, con la ayuda de un microscopio estereoscópico para así definir el tamaño y el corte de la muestras, se etiquetaron y se sumergieron en etanol absoluto. Posteriormente las muestras se desecaron en un sistema de punto crítico Samdri-780 B (Sample Drying at the Critical Point) a condiciones arriba del punto crítico del CO₂ (1070 psi, 31°C). Las muestras ya secas, se almacenaron en un desecador; se colocaron en los portaobjetos especiales y se pegaron con cinta de carbón, para así realizar el proceso de recubrimiento con carbón y oro, el cual se llevó a cabo en un recubridor de posición por ionización (BAL-TEC SCD 050, Liechteinstein), realizando primero una cubierta por medio de evaporación al vacío de carbón y una segunda cubierta con oro-paladio por ionización al vacío.

Se observaron las muestras en un microscopio de barrido de electrones (JEOL JSM-5900 LV, Tokio, Japón). El equipo se operó 5 kv de aceleración, obteniendo así una imagen de electrones secundarios SEI, la resolución de la imagen se analizó a 500x y 1000x.

5.8 Diseño experimental y análisis estadístico

Las muestras se asignaron a un modelo totalmente al azar, donde las fuentes de variación fueron: especie animal (cerdo y cazón), temperatura (4 y 15°C), tiempo de almacenamiento (0, 5, 10 y 15) y efecto de enzimas (endógenas –catepsinas y calpainas- y exógena –bacteriana–). Las variables de respuesta estudiadas se indican en la tabla 9.

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + q_j + t_k + u_l + p_i * q_j + p_i * t_k + q_j * t_k + p_i * q_j * t_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variables de respuesta

μ = media poblacional

p_i = efecto de la especie animal

q_j = efecto de la temperatura

t_k = efecto del tiempo de almacenamiento

u_l = efecto de las enzimas

$p_i * q_j$ = efecto de la interacción especie*temperatura

$p_i * t_k$ = efecto de la interacción especie*tiempo

$p_i * u_l$ = efecto de la interacción especie*enzimas

$q_j * t_k$ = efecto de la interacción temperatura*tiempo

$q_j * u_l$ = efecto de la interacción temperatura*enzimas

$t_k * u_l$ = efecto de la interacción tiempo*enzimas

$p_i * q_j * t_k * u_l$ = efecto de la interacción especie*temperatura*tiempo*enzimas

ε_{ijkl} = error experimental

Los resultados se sujetaron a análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Duncan (Steel y Torrie, 1988) usando un paquete estadístico SAS v. 6.12 (SAS Institute, 1996).

Tabla 9. Variables de respuesta analizadas

Cazón		Cerdo	
Materia prima	Actividad enzimática a pH 4 y 6 pH Poblaciones microbianas: Enterobacterias Psicrótrofos Concentración de aminas biogénicas: Putrescina Cadaverina Triptamina TMA	Materia prima	Actividad enzimática a pH 4, 6 y 7 pH Poblaciones microbianas: Enterobacterias Psicrótrofos Concentración de aminas biogénicas: Putrescina Cadaverina Triptamina
Extractos proteicos	Capacidad de formación de emulsión Índice de actividad de emulsión Estabilidad de emulsión Viscosidad aparente Concentración de grupos sulfhidrilo Modificación proteica*	Extractos proteicos	Capacidad de formación de emulsión Índice de actividad de emulsión Estabilidad de emulsión Viscosidad aparente Concentración de grupos sulfhidrilo Modificación proteica*
Emulsiones	Viscosidad aparente Distribución de proteínas en las fases de la emulsión* Microscopía óptica*	Emulsiones	Viscosidad aparente Proteínas de proteínas en las fases de la emulsión* Microscopía óptica*
Geles	Penetración SEM*	Geles	Penetración SEM*

* no analizado estadísticamente

6. Resultados y Discusión

6.1. Estudios Preliminares

6.1.1 Parámetros de almacenamiento

En el análisis de las temperaturas de abuso, el almacenamiento a 20 y 25°C no cumplieron 25 días de almacenamiento, debido a la descomposición de la carne en tiempos cortos de almacenamiento, por lo que descartaron del estudio.

A 15°C, y un tiempo de 25 días, las muestras empacadas al vacío presentaban formación de gas y mal olor; en la figura 5, se puede apreciar la formación de gas en las muestras de carne de cazón y de cerdo. Lo anterior probablemente se puede atribuir al crecimiento de bacterias anaerobias de descomposición, las cuales pudieron haber producido radicales libres, amonio y aminos biogénicas. (Nychas y col., 1998). Considerando lo anterior, se decidió reducir el tiempo de almacenamiento de la carne de ambas especies, a 15 días y utilizando como temperatura de abuso 15°C; y como una temperatura de conservación convencional 4°C.

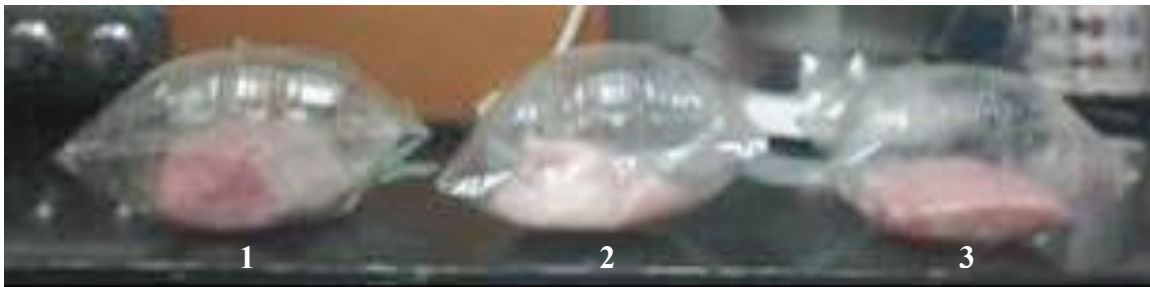


Figura 5. Muestras almacenadas durante de 25 días a 15°C:
1 y 3 carne de cerdo; 2: carne de cazón

6.1.2 Actividad enzimática endógena

El estudio de los parámetros de la actividad proteolítica de las enzimas endógenas de la carne de ambas especies, comprendieron el pH y tiempo de actividad de acuerdo a lo descrito en las secciones 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. La determinación de éstos parámetros ha demostrado que la actividad de las enzimas endógenas, catepsinas o calpainas, varía con respecto a la especie (McGrath, 1999; Delbarre-Ladrat y col., 2004), y dentro de la misma especie, debido a la raza, edad, sexo, tipo de músculo y situación fisiológica. (Yamashita y Konagaya., 1991; Gómez-Guillén y Batista, 1997; Delbarre-Ladrat y col., 2000; Haard, 2000)

Los extractos enzimáticos endógenos obtenidos a partir de carne de cazón mostraron actividad a pH 4 y 6 (Figura 6), mientras que en los obtenidos a partir de carne de cerdo mostraron actividad a pH 4, 6 y 7 (Figura 7). En el análisis enzimático de las dos especies, se observaron otros dos máximos de actividad proteolítica, a pH 10, y a pH 11. En éstos valores de pH se tuvo la mayor cantidad de péptidos solubles del sustrato utilizado. Lo anterior probablemente se debió a la desnaturalización de la caseína y del extracto enzimático, ya que a pH alcalinos las proteínas sufren cambios irreversibles en su forma estructural por lo que éste cambio quizá no sea debido a la acción de las calpainas, ni catepsinas, ya que de acuerdo con algunos autores (Yamashita y Konagaya., 1990; Somoza y col., 2000; Turk, y col., 2001; Delbarre-Labrat y col., 2004), las primeras no presentan actividades a pH alcalinos arriba de 8 y las segundas arriba de 6.

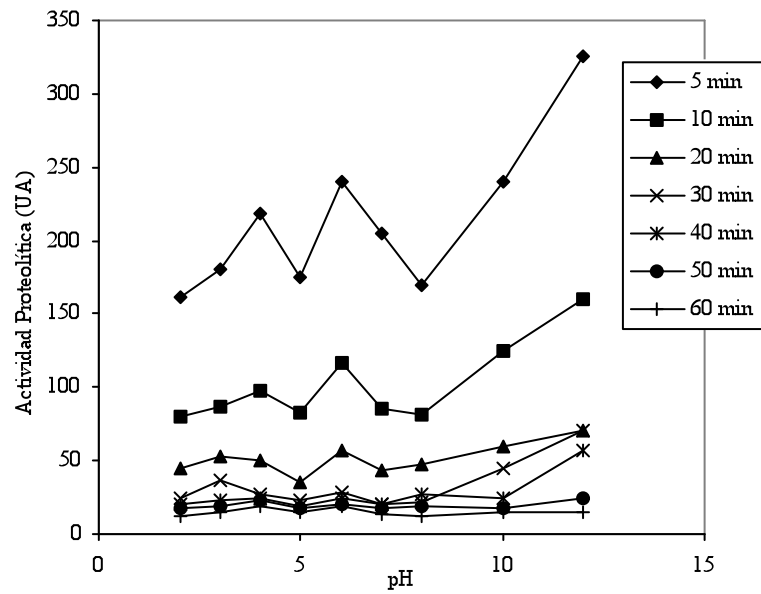


Figura 6. Actividad proteolítica endógena máxima en carne de cazón

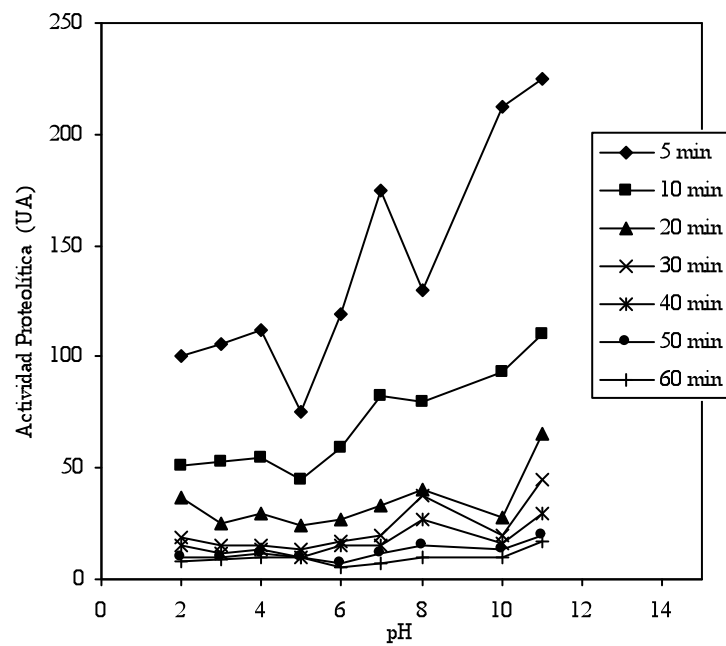


Figura 7. Actividad proteolítica endógena máxima en carne de cerdo

Se pudo observar que la actividad proteolítica fue mayor en las muestras de cazón que en las de cerdo, debido a la mayor concentración de enzimas que se encuentran en el músculo de especies marinas, en comparación con las terrestres (Cheret y col., 2007).

No se encontraron referencias en la literatura sobre la actividad proteolítica de carne de cazón de la especie capturada en el Golfo de México (*Rhizoprionodon terraenovae*). Sin embargo al comparar nuestros resultados con la actividad enzimática de otras especies de origen marino se observaron similitudes, ya que las enzimas endógenas con actividad en la región ácida son las principales responsables de la rápida descomposición del sustrato muscular, o autólisis, la cual es característica de la carne de productos marinos (Yamashita y Konagaya, 1991; Kristinsson y Rasco, 2000; Yongsawatdigul y col., 2000).

En forma contraria, la hidrólisis de carne de cerdo debida a enzimas endógenas ha sido ampliamente estudiada. Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los encontrados por otros autores (Wheeler y Koohmaraie, 1991; Rico y col., 1991; Kanawa y col., 2002).

En ambas especies, se observó que a los 5 min se produjo la proteólisis más alta, disminuyendo a medida que transcurría el tiempo de estudio. Debido a que 5 min era un tiempo muy corto para manipular las repeticiones de las muestras, se optó por aplicar un tiempo de 10 min en la reacción enzimática evitando así, errores experimentales. Algunos autores al estudiar la proteólisis *in vitro* de enzimas lisosomales y citosólicas, someten a las muestras a periodos de tiempo, que va desde minutos hasta días, con una variación en los sustratos, siendo los más utilizados las proteínas de sistemas musculares y algunas proteínas de grado analítico. Sin embargo, en algunos trabajos reportados (Yu y Lee, 1986; Jiang y col., 1992) se ha observado una actividad enzimática acumulada o residual debida a la sobrexposición del sustrato con la enzima, podría ocasionar una proteólisis no controlada o no detectada. En ésta tesis se propone una reacción enzimática en un tiempo mínimo para la obtención de resultados de los que se pueda eliminar la fracción de péptidos acumulados, destruidos o no detectados por la sobre exposición enzima-sustrato.

De los resultados obtenidos se concluyó que la actividad enzimática encontrada a pH 4, tanto en cazón como en el cerdo, podría ser atribuida a catepsinas, mientras que a pH 6 se debió a la

acción conjunta de catepsinas y calpainas, y a pH de 7, valor únicamente encontrado en el cerdo, se le atribuye a las calpainas. Ésta suposición está sustentada por los valores de pH de actividad encontrados en estudios de caracterización de catepsinas y calpainas purificadas de sistemas cárnicos (Jiang y col., 1992; Geesink y col., 2000; Moldoveanu y col., 2001; Kanawa y col., 2002).

6.1.3 Actividad proteolítica del extracto enzimático de *Pseudomonas fluorescens*

La producción de la enzima microbiana a partir de *Pseudomonas fluorescens* se realizó mediante las técnicas descritas en la sección 5.3.3. A la cepa se le realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio que era una cepa con una morfología de bastones pequeños (bacilos) y libre de bacterias Gram positivas.

Para conocer la capacidad proteolítica que presentaba la cepa, se incubó en placas de agar-caseína, observándose un halo cristalino alrededor de las colonias (Figura 8) lo que probablemente indique que es una proteasa extracelular. La formación del halo coincide con el final de fase exponencial y principios de la fase estacionaria. Lo anterior está sustentado con lo propuesto por Haarder (1979) en donde menciona que la producción máxima de proteasas está basada en la limitación de nutrientes por represión catabólica, por lo que las enzimas suministran otros nutrientes que puedan ser utilizados por el microorganismo.



Figura 8. Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* a 25 °C y 48 h, y halo generado por la hidrólisis de caseína

El resultado obtenido en ésta prueba fue similar al reportado por otros autores (Bucky y col., 1987; Fairbairn y Law, 1987; Alanís-García, 2003), en el sentido que la producción de la enzima se inicia al final de la fase exponencial o principios de la estacionaria de la vida del microorganismo. Lo anterior se propone debido a que el halo es generado a las 24 horas después de inocular el medio.

Posteriormente se llevaron a cabo análisis de actividad proteolítica de la enzima bacteriana (EB) en el extracto enzimático. Se utilizaron sustratos de hemoglobina y de caseína a pH 4 y 7, se utilizó como testigo a la tripsina. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10.

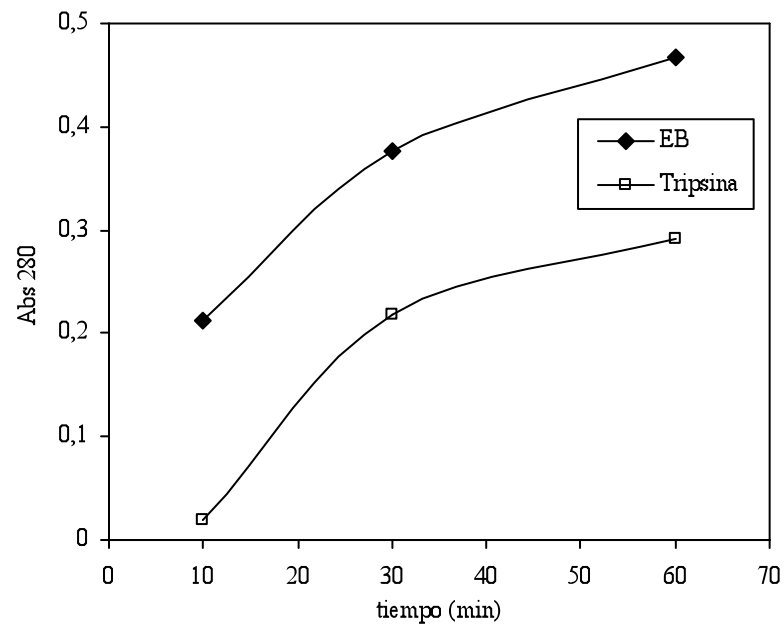


Figura 9. Actividad proteolítica del extracto enzimático de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* a pH 4

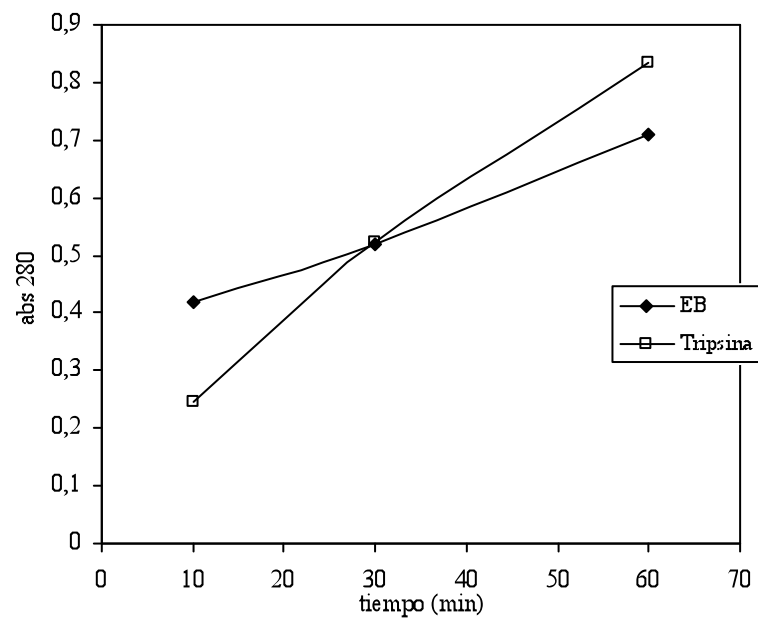


Figura 10. Actividad proteolítica del extracto enzimático de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* a pH 7

Además de determinar la actividad enzimática mediante el aumento de la absorbancia a 280 nm, se evaluó visualmente en los viales donde se realizó la reacción enzimática y se observó que la cantidad de sustrato era evidentemente menor en los viales con mayor actividad enzimática, como se muestra en la Figura 11.



Figura 11. Disminución del volumen de sustrato al aumentar la actividad de la enzima bacteriana. A: hemoglobina; B: sustrato caseína

A pH 4, la actividad de la tripsina es mayor que la de la EB (Figura 9); desde el principio de la reacción se observó mayor concentración de péptidos solubles debido a la acción de la EB. No obstante a pH 7 la actividad de la EB fue mayor a tiempo 0 pero disminuyó con el tiempo respecto a la actividad de la tripsina. Con ambas enzimas, la actividad fue mayor a pH 7. Éste valor alto de actividad probablemente se debe a que el pH óptimo de actividad de las proteasas extracelulares de *Pseudomonas* es próximo a la neutralidad o es alcalino, en el intervalo de 6.5-8.3 (Hernández, 1991). Sin embargo, la actividad a pH 4 de la EB, permanece dentro de un intervalo restringido, en el que pocas enzimas de origen bacteriano presentan actividad a pH ácidos, de ahí su importancia en la contaminación de productos lácteos (Yan y col., 1985; Hernández, 1991) cuyos valores de pH se encuentran en un rango ácido.

La actividad proteolítica de la EB y la tripsina también se evaluó por electroforesis no desnaturalizante, como se indica en la sección 5.3.3. Éste análisis también tuvo el objetivo de conocer el peso molecular del extracto enzimático de *P. fluorescens* y su pureza, corroborando los resultados de actividad obtenidos por el método espectrofotométrico.

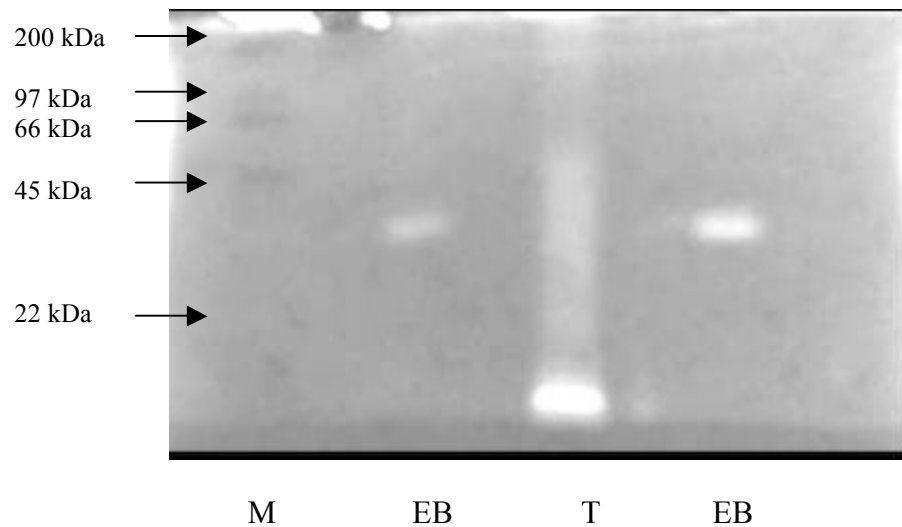


Figura 12. Electroforetograma en gel de caseína del extracto enzimático de *P. fluorescens*, M: Marcador de peso molecular; EB: enzima bacteriana; T: Tripsina

En la figura 12 se observa un gel de poliacrilamida que presenta la de actividad enzimática por zonas bioactivas (zimograma), en el cual se observa una sola banda bioactiva en la muestra inyectada con el extracto de EB, por lo que se concluyó que no había otra enzima de naturaleza proteolítica presente en el extracto. La banda encontrada en el zimograma mostró tener un peso molecular de aproximadamente 40 kDa, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Alanís-García, (1999) y por Hamamoto y col. (1994) que encontraron una sola banda al caracterizar la proteasa producida por otras cepas de *Pseudomonas*.

6.2. Materia Prima: Músculo estriado de cazón y cerdo

6.2.1. Actividad proteolítica debida a enzimas endógenas (EE) y exógena (EB)

Una vez determinado que los máximos de actividad enzimática endógena en carne de cazón fueron a pH 4 y 6 (sección 6.1.2), se obtuvo el perfil de actividad proteolítica de los tratamientos endógeno y exógeno, evaluando en las dos temperaturas (4 y 15°C) de almacenamiento, durante 15 días de estudio. El efecto de la actividad enzimática con respecto al tiempo de almacenamiento en la carne de cazón se muestra en las Figuras 13 y 14.

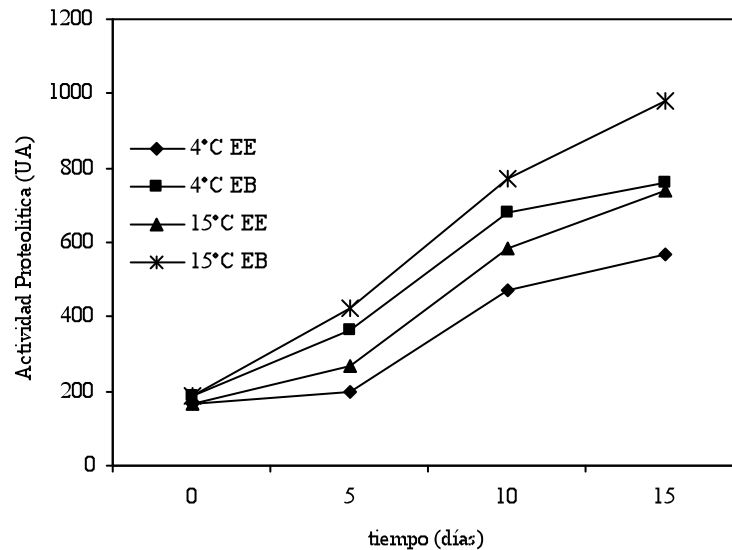


Figura 13. Actividad proteolítica (pH 4) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cazón

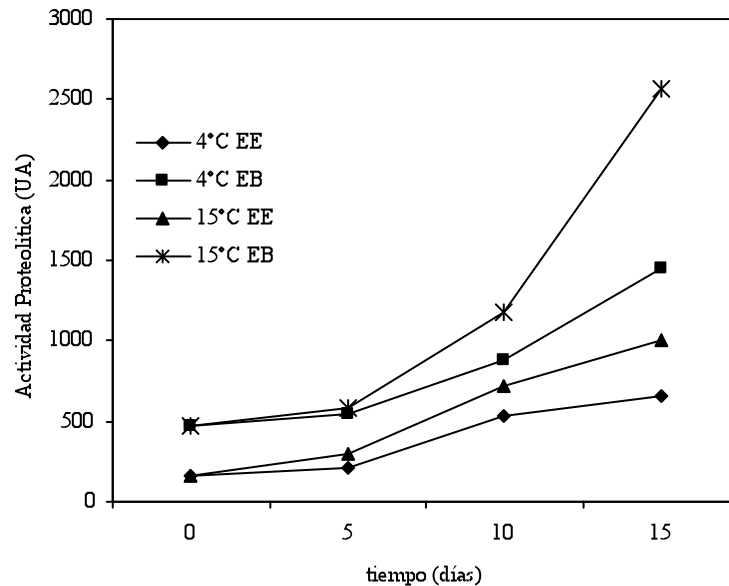


Figura 14. Actividad proteolítica (pH 6) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cazón

En todos los casos, la actividad aumentó con respecto al tiempo. En la carne de cazón al tiempo 0, en las muestras analizadas a pH 4, se observaron valores de actividad similares a 4 y a 15°C; mientras que hubo diferencia al mismo tiempo a pH 6. A los 15 días, las medias de actividad evaluada en éstos valores de pH, se observaron más altos (763 UA a pH 4 y 1417.916 UA pH 6), y al día 5 los más bajos (314.083 UA a pH 4 y 407.083 UA a pH 6) (Anexo VI), de lo cual se podría concluir que la proteólisis de las proteínas miofibrilares se incrementa con el tiempo de almacenamiento.

El efecto ocasionado por el pH 6 sobre la actividad enzimática en las muestras de cazón inmersas en EB, dió como consecuencia valores más altos que a pH 4, posiblemente debido a las condiciones óptimas de actividad de la EB, ya que es más activa a pH cercanos a la neutralidad que a valores ácidos (Alford y Elliot, 1960). En cuanto a la temperatura de almacenamiento, la comparación de las medias de actividad fue significativamente mayor a 15°C (507.25 UA a pH 4 y 871.04 UA a pH 6) que a 4°C (433.75 UA a pH 4 y 611.96 UA a pH 6), lo cual fue atribuido a que la temperatura óptima de actividad de las proteasas con acción ácida es a 37°C (An y col., 1994; Cheret y col., 2007); mientras más cercana sea la temperatura al óptimo, la actividad se incrementa, observándose un decremento a 4°C, donde la enzima presenta una baja actividad. La

comparación entre los tratamientos endógeno (EE) y exógeno (EB), los valores medios de actividad enzimática de las muestras tratadas con EE tuvieron los valores menores (395.208 UA a pH 4 y 467.50 UA a pH 6) que las inoculadas con EB (545.417 UA a pH 4 y 1015.50 UA a pH 6), lo que puede deberse a que la EB se empleó parcialmente purificada, presentando así cierto grado de hidrólisis que no ocurrió en el caso de EE. El análisis de varianza (Anexo V) mostró diferencias significativas ($P > 0.001$) en la actividad enzimática a pH 4, debida a todas las fuentes de variación consideradas (tiempo, enzimas endógenas o exógenas y temperatura de almacenamiento) así como a las interacciones. En el caso de la actividad enzimática a pH 6, solamente se detectó que no había diferencia significativa ($P > 0.015$) en la interacción de tiempo-temperatura, debido posiblemente al óptimo de actividad, más cercano a temperaturas de 15°C, y a pH cercanos a la neutralidad.

Por otro lado, en la carne de cerdo, se observó actividad proteolítica a pH 4, 6 y 7, la cual se muestra en las figuras 15, 16 y 17.

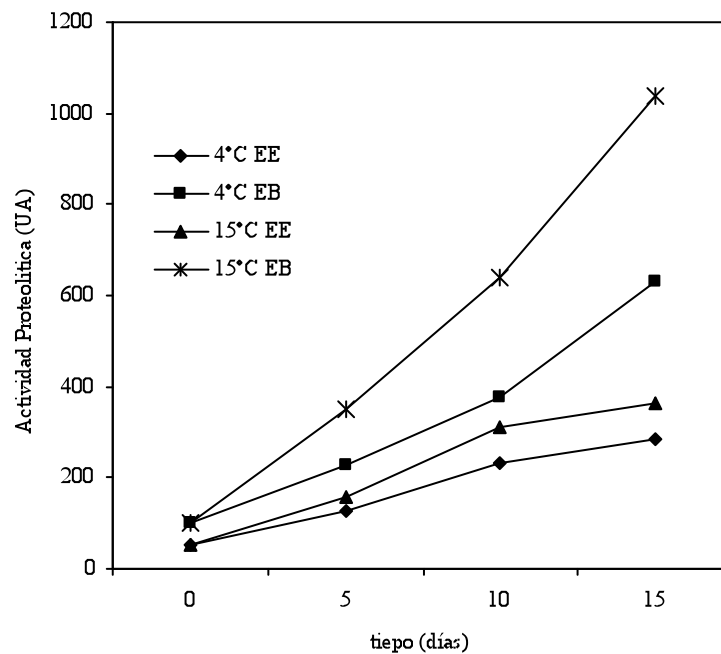


Figura 15. Actividad proteolítica (pH 4) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo

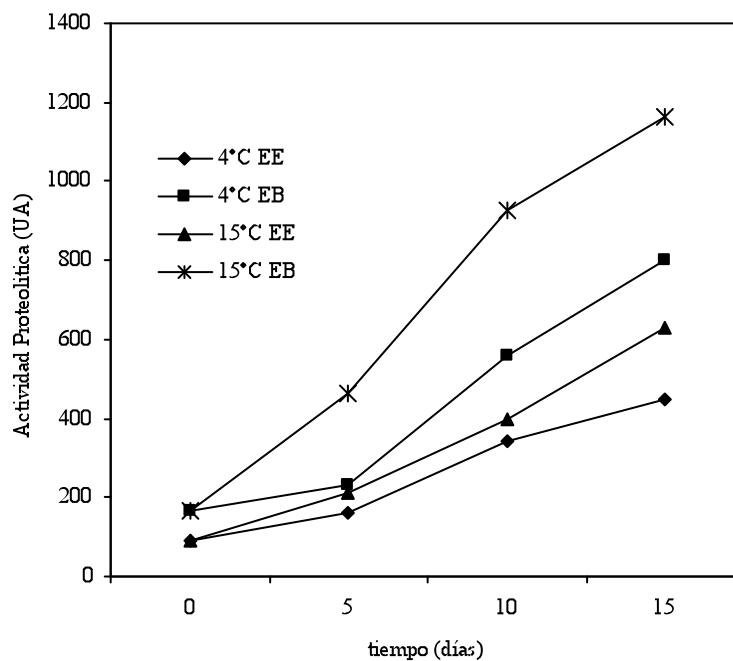


Figura 16. Actividad proteolítica (pH 6) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo

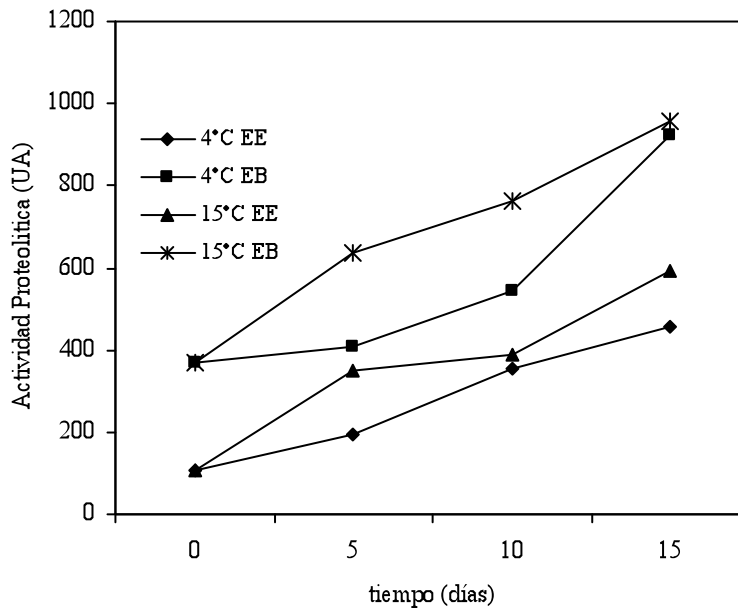


Figura 17. Actividad proteolítica (pH 7) debida a enzimas endógenas (EE) y exógenas (EB) en carne de cerdo

En las muestras de cerdo, de forma similar a las muestras de cazón, se observó un incremento en la actividad proteolítica a través del tiempo de estudio; la comparación de las medias de las temperaturas, los valores fueron también más altos en muestras almacenadas a 15°C (376.313, 506.125 y 521.099 UA a pH 4, 6 y 7 respectivamente) que a 4°C (253.141, 349.943, y 419.141 UA a pH 4, 6 y 7 respectivamente) (Anexo VIII). La comparación de las medias entre los tratamientos, mostraron que el efecto de las EE fue menor (196.870, 296.734, y 318.990 a pH 4, 6 y 7 respectivamente) al encontrado en las muestras tratadas con EB (432.580, 559.33, y 621.250 UA a pH de 4, 6 y 7 respectivamente).

En la carne de cerdo, tanto las fuentes de variación (tiempo, temperatura y tratamiento enzimático) como las interacciones tuvieron diferencias significativas en la actividad enzimática a los tres pH estudiados (Anexo VII).

La comparación de las medias actividad proteolítica entre las muestras de cazón y de cerdo sólo se llevó a cabo a pH 4 y 6, ya que la actividad a pH 7 solo se observó en cerdo (Anexo X). En ambas especies se encontró un incremento de actividad con respecto al tiempo de almacenamiento. A pH 4 se observó una actividad máxima mayor en cerdo que en cazón (470.313 y 314.727 UA, respectivamente) (Anexo X); contrariamente a pH 6, se observó que la actividad menor la tuvo el cerdo en comparación con cazón (428.03 y 741.50 UA respectivamente), debido a una mayor actividad de catepsinas-calpains en cazón como se observa en las figuras 13 y 15. La alta actividad presentada en especies de origen marino, es un factor determinante en la vida útil de carne de origen marino, ya que las reacciones autolíticas debidas a proteólisis de origen endógeno, causa pérdidas en la calidad (Sikorski y Kolakowska, 2000; Haard, 2002).

Como era de esperarse, la comparación de las medias de actividad de las temperaturas, entre las especies fue mayor a 15°C (441.781 y 688.58 UA a pH 4 y 6 respectivamente), que a 4°C (343.258 y 480.95 UA pH 4 y 6 respectivamente) (Anexo X), observándose en ambos casos mayor actividad a pH 6. An y col. (1995) y Vissesaguan y col. (2001) reportaron que la actividad enzimática a pH 6 en especies marinas se atribuye a las catepsinas D y L, sin embargo, con los resultados del presente trabajo no se podría asegurar que la actividad proteolítica se debió a éstas

enzimas debido a que no se identificaron las enzimas presentes, ya que se utilizó un extracto enzimático en el cual estaban presentes varias enzimas con actividad ácida

La comparación de las medias de actividad enzimática de los tratamientos entre especies a pH 4 la mayor actividad fue encontrada en el tratamiento con EE (489 UA), y la menor actividad la tuvieron las muestras tratadas con EB (382.12 UA), contrariamente a lo ocurrido en la determinación a pH 6 en el que el valor mayor de actividad lo obtuvo el tratamiento con EB (382.12 UA) y el menor con EE (787.42 UA) (Anexo X).

En general, el comportamiento de las EE de los animales marinos no es tan marcado en las canales de animales terrestres debido a la concentración de las enzimas en el músculo y a la estructura del músculo estriado de origen terrestre (Cheret y col., 2007). Éstos autores también observaron diferencias de actividad entre especies de origen marino y terrestre, con mayor actividad en las especies de origen marino. Éste comportamiento depende también del estado en el que se encuentra la enzima, ya que, como se observó con la EB –parcialmente purificada- tuvo mayor actividad en todos los casos.

Por otra parte, la actividad proteolítica se estudió en sustratos grado reactivo analítico, y no en un sustrato de origen miofibrilar, lo que mostraría resultados más fidedignos, si bien, la técnica de estudio que se empleó ayuda a interpretar el comportamiento de las enzimas en un sustrato de concentración controlada y por tanto sin interferencia de otros compuestos presentes, lo que no permitiría diferenciar los cambios ocurridos en las proteínas miofibrilares debido a la actividad proteolítica o a otras interacciones químicas, y en consecuencia en algunas propiedades fisicoquímicas y moleculares.

6.2.2 pH

La variación del pH de músculo de cazón y cerdo con respecto al tiempo de almacenamiento se muestra en las figuras 18 y 19.

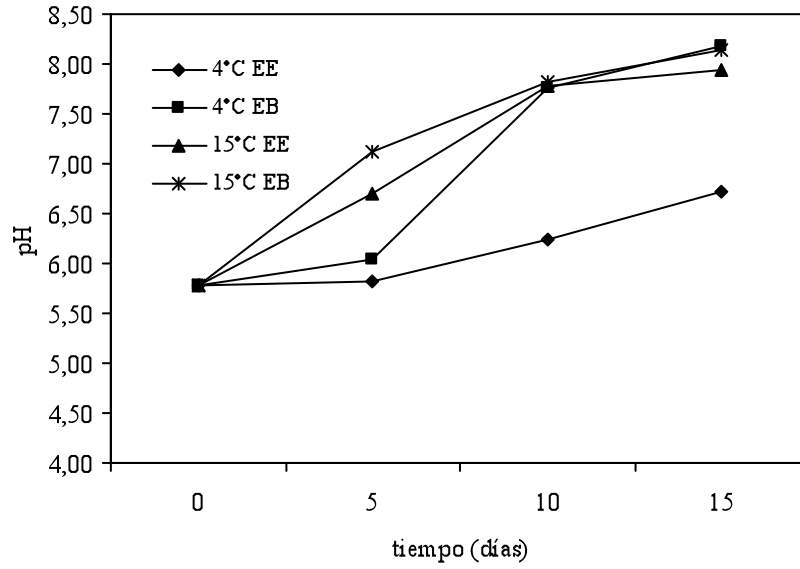


Figura 18. pH en músculo estriado de cazón

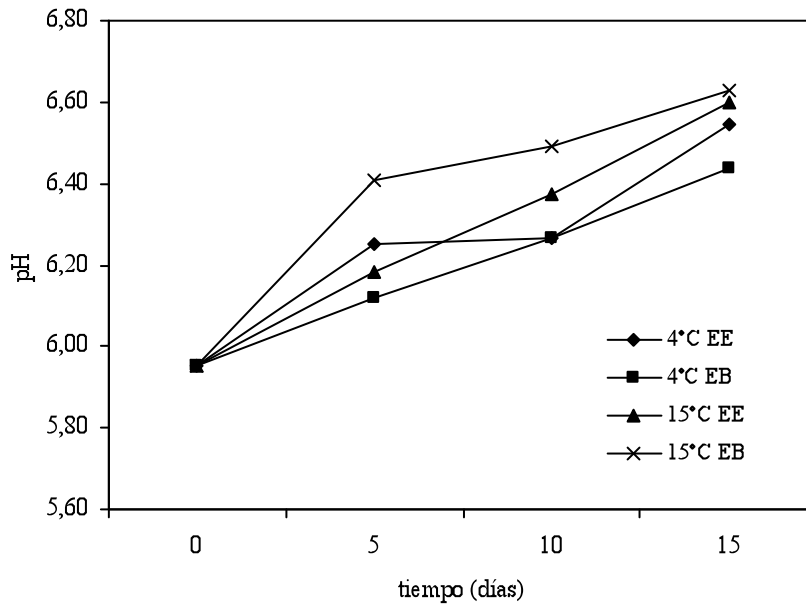


Figura 19. pH en músculo estriado de cerdo

El cambio en el pH de la muestra afecta a la estructura de las proteínas miofibrilares, ya que existen cambios en las cargas negativas de las proteínas (Pearson y Young, 1989).

La comparación de valores medios de pH de la carne de cazón entre las temperaturas, los resultados mostraron más alcalinidad a 15 que a 4°C (7.13 y 6.35 respectivamente) (Anexo VI).

El tipo de tratamiento tuvo una diferencia significativa ($P < 0.001$) en cazón (pH 6.59 y 7.08, EE y EB respectivamente) (Anexo VI), debido a la acción enzimática, ya que como se observó anteriormente, las muestras tratadas con enzima EB obtuvieron mayor actividad proteolítica y que juntamente con la formación de colonias de enterobacterias y de psicrótrofos en la superficie de la carne probablemente ocasionó un aumento del valor de pH, debido a cambios en la carga total de las proteínas. Todas las fuentes de variación y las interacciones tuvieron diferencias significativas en pH en carne de cazón (Anexo V).

Los valores medios de pH de la carne de cerdo tuvo una diferencia significativa ($P < 0.001$) con respecto al tiempo, (5.9, 6.24, 6.35 y 6.55, a los días 0, 5, 10 y 15). El tipo de tratamiento no tuvo una diferencia significativa ($P > 0.285$) (pH 6.26 y 6.28, EE y EB respectivamente) (Anexo VIII). Como era de esperarse, los valores medios de pH en carne de cerdo fueron más altos a 15°C (6.32) que a 4°C (6.22). Lo anterior podría indicar que el incremento de temperatura, con la adición de una proteasa exógena, promovió una hidrólisis que produjo fracciones peptídicas y finalmente aminoácidos que pudieran ser descarboxilados a aminas, las que aumentaron el pH.

La comparación de la media del pH entre especies (Anexo IX), el pH medio en el cazón fue mayor (6.83) que el cerdo (6.25). Lo anterior deriva de que en los animales de origen marino el músculo contiene un nivel relativamente bajo de glucógeno, comparado con los mamíferos y por ésta razón se genera mucho menos ácido láctico después de la muerte tienen pH alcalino (Li-Chan y col., 1985; Huss, 1995; Cofrades y col., 1996). En la comparación de las medias de ambas especies se observó un aumento de pH a lo largo del tiempo de estudio (5.86, 6.32, 6.87, y 7.151; para 0, 5, 10 y 15 días). Lo anterior probablemente ocurrió debido a la alteración de las proteínas por la acción de enzimas y la producción de compuestos aminados por acción de microorganismos. Éste aumento de pH durante el almacenamiento ya ha sido reportado (Ouali,

1992; Kristinsson y Rasco, 2000) donde se ha demostrado que un incremento de éste parámetro físico, está relacionado con la desnaturalización de las proteínas, y por la población de microorganismos encontrados.

El empacado al vacío de las muestras ayudó a contrarrestar la proliferación de aerobios, sin embargo pudieran proliferar microaerófilos como algunas bacterias lácticas descarboxilantes las cuales, junto con las enzimas endógenas y la bacteriana, probablemente producen cambios en valores de pH (Naguib y col., 1995).

6.2.3 Poblaciones microbianas

Debido a que los cambios estructurales de las proteínas pueden ser una consecuencia de la actividad de metabolitos microbianos (Jiang, 2000), se realizaron cuentas totales de enterobacterias y psicrótrofos. Se sabe que los microorganismos emplean en primer lugar a los carbohidratos, y al agotarse éstos utilizan a las proteínas (Harder, 1979; Nychas y col., 1998); sin embargo, debido a la baja concentración de carbohidratos en la carne, la utilización de proteínas es casi inmediata, modificando a las propiedades físicas de las proteínas. La importancia del conteo de poblaciones de enterobacterias y psicrótrofos es que son microorganismos indicadores de contaminación y en acción conjunta llevan a la descomposición de la carne, y con la refrigeración se pretende limitar éste hecho. Sin embargo los microorganismos psicrótrofos, pueden crecer a temperaturas de refrigeración y son productores de proteasas (Surhen, 1992).

La flora bacteriana de los animales acuáticos está relacionada con la zona geográfica donde vive, el método de pesca, la temperatura del agua, el tipo de alimentación, la manipulación durante la captura o cosecha y las condiciones de almacenamiento (Huss, 1995; Haard, 2000). Por otro lado, la flora microbiana en la carne de cerdo depende principalmente de la manipulación y condiciones de almacenamiento después del sacrificio. Sin embargo la flora con actividad descarboxilante proviene de contaminaciones externas, principalmente con psicrótrofos Gram negativos, como las *Pseudomonas* y algunas enterobacterias (García-López y col., 1998).

Enterobacterias

Las poblaciones de enterobacterias en la carne cazón durante el tiempo de estudio se observa en la Figura 20.

La comparación de las medias de las poblaciones de enterobacterias, en las muestras de cazón fueron mayores a 15°C que a 4°C (2.209 y 1.895, respectivamente) debido a que las enterobacterias crecen a temperaturas altas, aunque hay reportes de algunas enterobacterias psicrófilas (Surhen, 1992; Huss, 1995 y Leclerc y col., 2001).

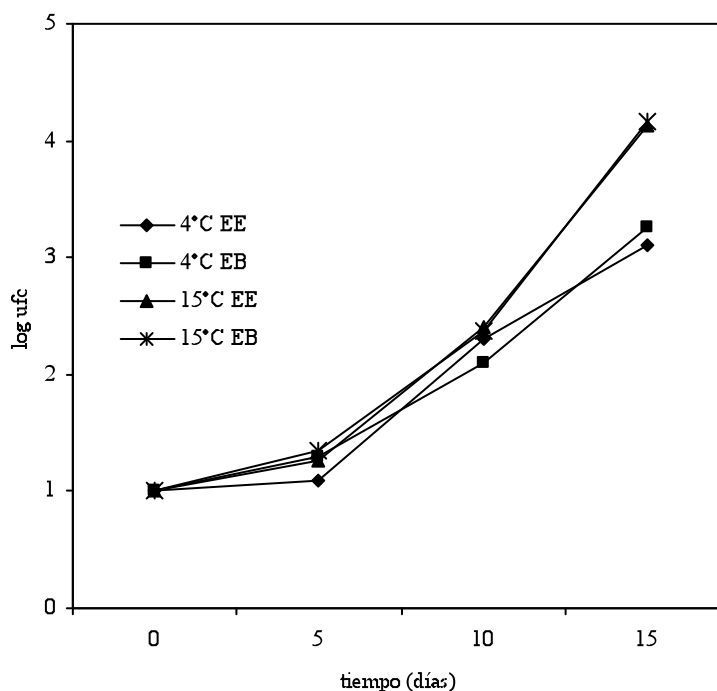


Figura 20. Poblaciones de enterobacterias en carne de cazón

Además el análisis estadístico en las medias de las muestras de cazón mostraron diferencias significativas ($P > 0.001$) por efecto del tiempo (1, 1.2, 2.2, 3.6 log ufc/g para 0, 5 10 y 15 días de almacenamiento). Éste aumento en las poblaciones de enterobacterias con respecto al tiempo, está ligado con el aumento del pH en la carne debido a la degradación de productos como amoniaco, aminos orgánicas y sulfuros.

El tipo de tratamiento no tuvo diferencias significativas ($P > 0.001$), los valores medios de población fueron 2.17 y 2.05 log ufc/g para EE y EB, respectivamente (Anexo VI). Éste resultado

indicó que la formación de enterobacterias es independiente del tratamiento, y que el aumento gradual con respecto al tiempo en los dos tratamientos probablemente radicó en la población inicial (1 log ufc/g). Aunque no se descarta la idea de que un análisis del conteo de enterobacterias en los extractos enzimáticos: endógeno y exógeno, afirmaría éste hecho.

Las poblaciones de enterobacterias en muestras del cerdo se muestran en la figura 21

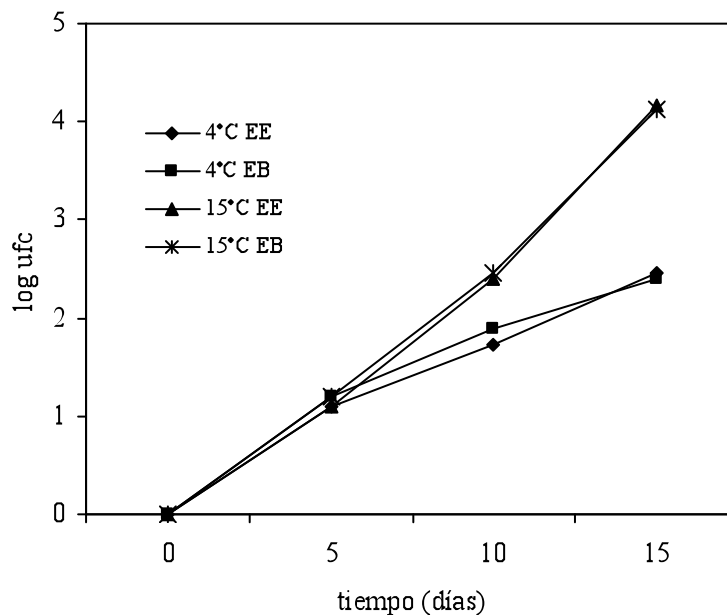


Figura 21. Poblaciones de enterobacterias en carne de cerdo

Al igual que en la carne de cazón, las poblaciones de enterobacterias en carne de cerdo aumentaron a lo largo del tiempo de estudio (figura 21), mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) debido al tiempo (0, 1.22, 2.12, 3.29 log ufc/g, para el día 0, 5, 10 y 15, respectivamente). A pesar de que en el tiempo inicial no hubo presencia de enterobacterias, el aumento gradual pudo haber sido por el efecto de la toma de las muestras ya que se eliminó la superficie de la carne, estando prácticamente estéril. Sin embargo la toma de muestras en los otros días y en los dos tratamientos se realizó sin quitar la superficie de la carne para observar el efecto de la inmersión en el extracto de enzima bacteriana.

Las medias de la temperatura de almacenamiento mostraron diferencias significativas (1.36 y 1.95 log ufc/g, para 4 y 15°C, respectivamente), debido a que a altas temperaturas, las enterobacterias se desarrollan más rápidamente que a temperaturas bajas.

En cuanto al tipo de tratamiento, no se encontraron diferencias significativas (1.64 y 1.67) ($P > 0.001$) (Anexo VII) por lo que se deduce que el tipo de tratamiento no influye en la formación de enterobacterias.

Al comparar las medias de las poblaciones de enterobacterias entre especies se observó que hubo diferencia significativa ($P < 0.001$), siendo mayor en cazón (2.052 log ufc/g) que en cerdo (1.660 log ufc/g) (Anexo X). Ésta diferencia probablemente sea debida a que los animales acuáticos son más susceptibles al ataque por microorganismos durante las operaciones de captura y almacenamiento (Liston, 1992; Huss, 1995), además que se ha reportado que la flora bacteriana inicial en pescados de agua templada está dominada por bacterias Gram negativas (Pascual-Anderson, 2000), entre los que sin duda se encuentran las enterobacterias.

Psicrótrofos

Las poblaciones de psicrótrofos en cazón se muestran en la Figura 22.

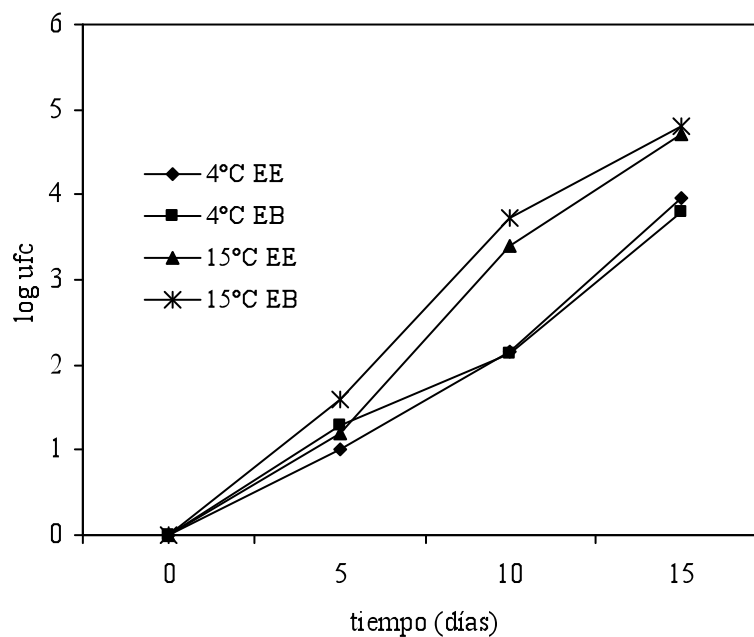


Figura 22. Poblaciones de psicrótrofos en carne de cazón

Al igual que las poblaciones de enterobacterias en carne de cazón, las de psicrótrofos tuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) causadas por el tiempo y la temperatura, pero no por el tipo de tratamiento ($P > 0.001$) (Anexo V), con valores medios de 2.037 y 2.067 log ufc/g para tratamientos con EE y EB, respectivamente (Anexo VI).

Éstos resultados indican que al parecer el extracto de EB estaba libre de células de *Pseudomonas*, ya que de haber estado presentes, se esperaría que la cantidad de psicrótrofos hubiera sido mayor en el efecto del tratamiento con EB.

Las muestras almacenadas a 15°C mostraron los valores de población más altos que a 4°C (2.42 y 1.79 log ufc/g, respectivamente), esto implica que la refrigeración retarda ligeramente el crecimiento de psicrótrofos y en consecuencia, la producción de proteasas que alteran la estructura proteica (Haynes, 1993; James y James, 2002), aunque tanto el crecimiento psicrótrofos y la producción de proteasas, no se suprimen, el uso de éste proceso de conservación retarda éstos efecto (Pascual-Anderson, 2000).

Las poblaciones de psicrótrofos en carne de cerdo se muestran en la figura 23.

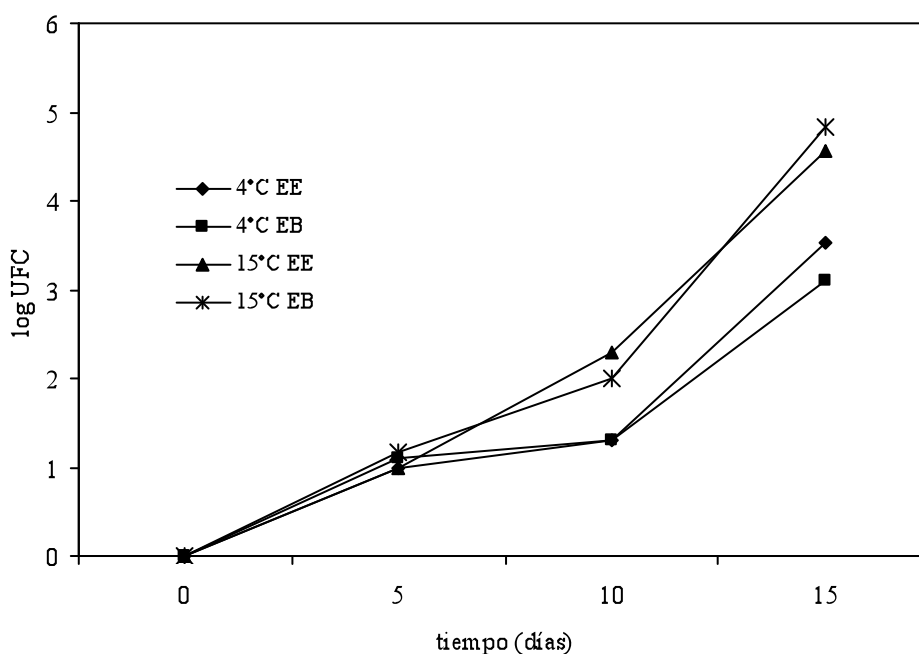


Figura 23. Poblaciones de psicrótrofos en carne de cerdo

Las poblaciones de psicrótrofos en carne de cerdo aumentaron a lo largo del tiempo de estudio, mostrando diferencias significativas ($P < 0.001$) (0, 1.06, 1.72, 4.008 log ufc/g, para el día 0, 5, 10 y 15, respectivamente).

En la comparación de las medias de las poblaciones de psicrótrofos, las muestras de cerdo fueron mayores a 15°C que a 4°C (1.98 y 1.41, respectivamente), éste hecho se fundamenta en que debido a que los psicrótrofos son organismos que pueden crecer a temperaturas de refrigeración, no significa que sea la temperatura óptima de crecimiento y de desarrollo, ya que existen algunas especies que se desarrollan óptimamente hasta los 30°C (Suhren, 1992).

EL número de psicrótrofos fue también independiente del tipo de tratamiento (1.71 y 1.68 log ufc/ g), no encontrando diferencias significativas.

En la comparación entre las especies se tuvo mayor población de psicrótrofos en muestras de carne de cazón (2.11 log ufc/g) que en las de cerdo (1.7 log ufc/g) (Anexo X), a pesar que no se encontraron colonias psicrótrofas al inicio del tiempo, lo cual pudo deberse a la forma en que se tomaron las muestras, en la cual se descartó la superficie de la carne, quedando prácticamente estéril; la literatura reporta que los animales marinos son más susceptibles que los terrestres, lo cual es debido a la contaminación, durante la captura, manipulación, eviseración y forma de almacenamiento, y se ha observado que animales marinos de agua templada presentan una flora bacteriana inicial dominada por bacterias Gram negativas, bacilos psicrótrofos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Vibrio*, siendo las *Pseudomonas sp.* y *Alteromonas sp.* las más abundantes (Huss, 1995).

Por los resultados obtenidos se dedujo que el extracto enzimático de EB estaba libre de células de *Pseudomonas*, ya que los valores de la población microbiana fueron muy similares entre tipo de enzimas. Si éstos valores hubieran sido mayores en el tratamiento con EB, sería un indicativo de un extracto enzimático contaminado por *Pseudomonas*, y como consecuencia la degradación de las proteínas por acción microbiana. El empacado al vacío de las muestras ayudó a contrarrestar la proliferación de microorganismos aerobios, aunque pudieron proliferar microaerófilos, como algunas bacterias lácticas productores de enzimas aminoácido descarboxilantes, las cuales en

conjunto con las EE y EB generan cambios en algunos aminoácidos, modificando a la vez la calidad de la carne y la funcionalidad proteica (Hotchkiss, 1988; Jiang, 1998; Jiang, 2000).

6.2.4. Concentración de aminas biogénicas

Varios autores han propuesto que las aminas biogénicas se generan por la descarboxilación de aminoácidos por acción de microorganismos principalmente de enterobacterias y psicrótrofos (*Pseudomonas*) (Naguib y col., 1995; Bozkurt y Erkmen, 2004).

Éstos compuestos han sido propuestos como posibles indicadores de deficiencia en la higiene de la carne cruda, y en las condiciones asépticas del proceso (Ordoñez y col., 1999, Ruíz-Campillas y Jiménez-Colmenero, 2004). Aunado a esto, se propone que las reacciones enzimáticas *post mortem*, principalmente proteolíticas, están involucradas en la formación de aminoácidos libres, siendo éstas reacciones más intensas en especies animales de origen marino (Sotelo y Rhebien, 2000; Benner y col., 2003).

Al inicio del estudio las muestras de cazón y cerdo mostraron valores bajos en todas las aminas biogénicas analizadas, lo cual concuerda con lo reportado por algunos autores (Halász y col., 1994; Ruiz-Campillas y Jiménez-Colmenero, 2004) quienes indican que el contenido de aminas biogénicas en carne fresca es muy bajo; sin embargo, a medida que avanza el deterioro de los sustratos cárnicos aumenta el contenido de aminas biogénicas debido a la descarboxilación de los aminoácidos precursores de las aminas por mecanismos de origen bacteriano.

En carne de cazón, las muestras almacenadas a 15°C tuvieron mayor concentración de todas las aminas estudiadas: cadaverina, putrescina, triptamina y trimetilamina (TMA) (Anexo VI), mientras que en carne de cerdo, donde se estudiaron solamente tres aminas (cadaverina, putrescina y triptamina) mostraron comportamiento diferente; la cadaverina estuvo en mayor concentración en muestras almacenadas a 4°C, mientras las muestras almacenadas a 15°C tuvieron mayor concentración de putrescina y triptamina (Anexo VIII).

Cadaverina

Las concentraciones de cadaverina en las muestras de cazón y cerdo se presentan en las figuras 24 y 25. En ambas especies, no hubo presencia de cadaverina al inicio del estudio.

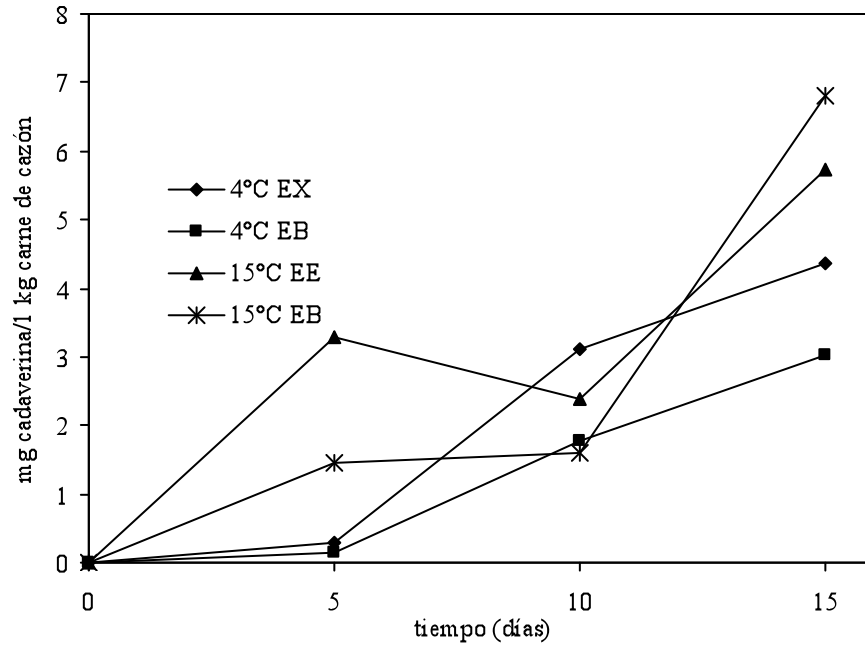


Figura 24. Concentración de cadaverina en carne de cazón

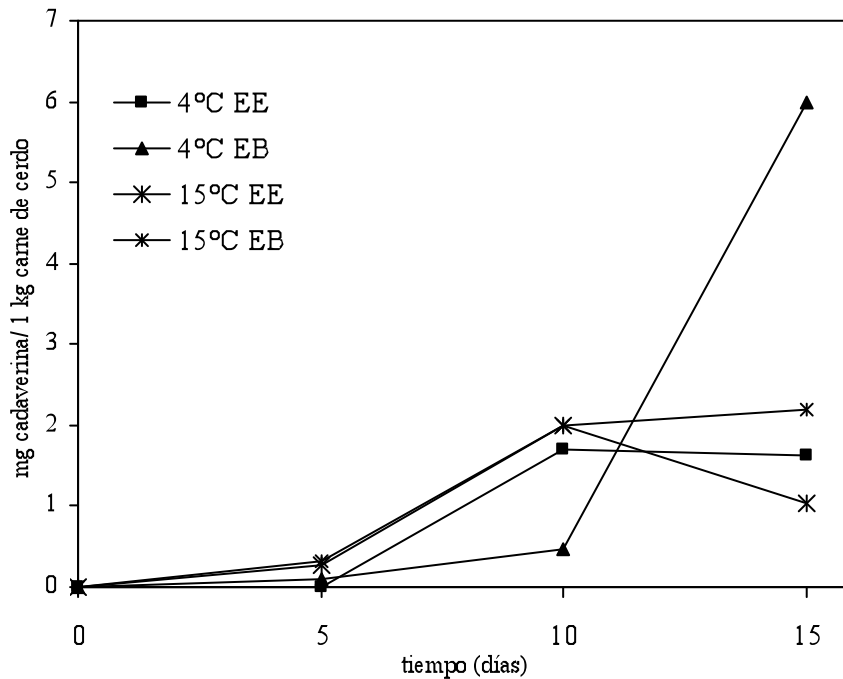


Figura 25. Concentración de cadaverina en carne de cerdo

La formación de cadaverina en la carne de cazón se vio favorecida con el tiempo de almacenamiento (0, 1.290, 0.2243, 4.980 mg/kg a 0, 5, 10 y 15 días, respectivamente) ya que la formación de ésta amina ésta relacionada con población de enterobacterias, cuyos valores fueron ascendiendo con respecto al tiempo de estudio, probablemente el valor encontrado en el tercer día de estudio fue error experimental.

La comparación de las medias a 4 y 15°C mostraron que la formación de cadaverina en el cazón estuvo favorecida por la temperatura (2.657 mg/kg a 15°C; 1.590 mg/kg a 4°C) (Anexo VI), mientras que en el cerdo fue mayor a temperaturas bajas de almacenamiento, ya que tuvo mayor concentración a 4°C (1.238 mg/kg a 4°C; 0.975 mg/kg a 15°C) (Anexo VIII).

El efecto del tratamiento enzimático (EE y EB) en la carne de cazón con respecto a la concentración de cadaverina tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$), ya que se observaron valores más altos en el tratamiento con EE (2.395 mg /kg) que con EB (1.852 mg/kg) (Anexo VI), lo que se interpretó como una mayor actividad de las EE del cazón en la descarboxilación de la lisina en comparación con la descarboxilación debida a EB.

En la carne de cerdo, al igual que en la de cazón se vio favorecida con respecto al tiempo de estudio (0, 1.691, 1.541, 2.713 mg/ kg, a 0, 5,10 y 15 días, respectivamente). Lo que concuerda con los valores ascendientes en la cuenta total de enterobacterias a lo largo del estudio.

La concentración de cadaverina por efecto del tratamiento en la carne de cerdo tuvo diferencias significativas. Las comparación de las medias de las muestras tratadas con la EB tuvo los valores más altos (8.303 mg/kg) en comparación con el tratamiento de enzimas endógenas (1.383mg/kg) (Anexo VIII), lo que puede atribuirse a la baja actividad que tienen las enzimas endógenas de cerdo en comparación con las de cazón.

En la comparación de las medias entre las especies con respecto a la concentración de cadaverina (Anexo X) indicó que la carne de cazón tuvo mayor concentración de cadaverina que la carne de cerdo (2.123 y 1.107 mg/kg, respectivamente) (Anexo X). Éstos resultados concuerdan a lo propuesto por Rossi y col. (2002) quienes indican que la concentración de cadaverina está

relacionado con la población de enterobacterias, ya que en éste estudio fue mayor en muestras de cazón que en cerdo 2.052 y 1.66 log ufc/g respectivamente.

La producción de cadaverina está relacionada con la población de enterobacterias, cuanto mayor sea la población de éstas, aumentará la concentración de cadaverina (Halász y col., 1994, Bover-Cid y col., 2001); por lo que a pesar de haber descartado la superficie de la carne durante la toma de muestras, éstos resultados se pueden relacionar a los encontrados al inicio del tiempo de estudio, en el que las muestras no contenían cadaverina, por lo cual probablemente no había enterobacterias al inicio del estudio. Sin embargo, al haber una población de enterobacterias, la concentración de cadaverina aumentó con el tiempo de almacenamiento. A pesar que se ha reportado que para que las enterobacterias produzcan ésta amina biogénica, la población de éstas deberá ser del orden de 5 log ufc/g de carne (Halász y col., 1994), sin embargo en el presente trabajo, las poblaciones de enterobacterias fueron menores a las sugeridas por éstos autores, ya que las medias de las poblaciones de enterobacterias obtenidas entre especies fueron del orden de 1, 1.25, 2.2 y 3.6 log ufc/g en cazón a 0, 5, 10 y 15 días de almacenamiento y 1.2, 2.1, y 3.2 log ufc/g en cerdo a 5, 10 y 15 días de almacenamiento. Éstos resultados podrían proponer que probablemente la descarboxilación de lisina a cadaverina puede ser atribuible a poblaciones de enterobacterias desde 1 log ufc/g.

Putrescina

La putrescina es una amina producida por la descarboxilación de la arginina, vía ornitina; a la vez, es un precursor en la formación de otras aminas biogénicas como espermina y espermidina (Tamim y col., 2002).

La concentración de putrescina en carne de cazón y de cerdo se muestra en las figuras 26 y 27, respectivamente.

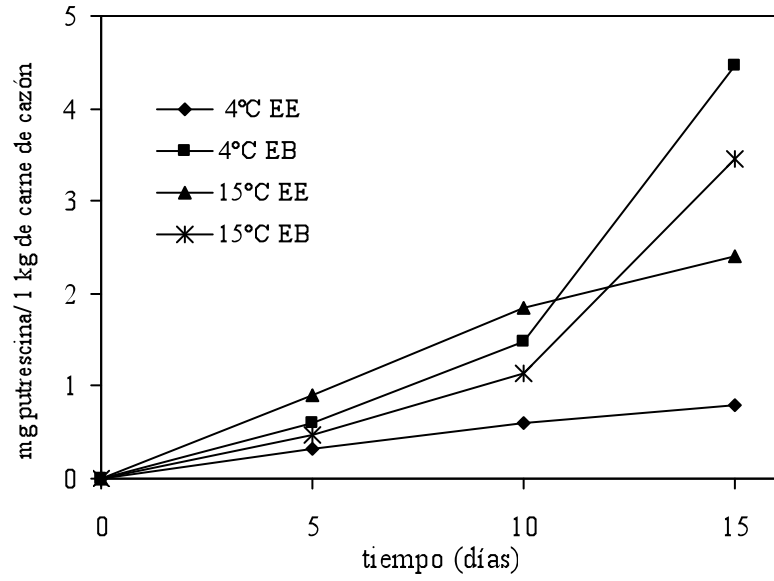


Figura 26. Concentración de putrescina en carne de cazón

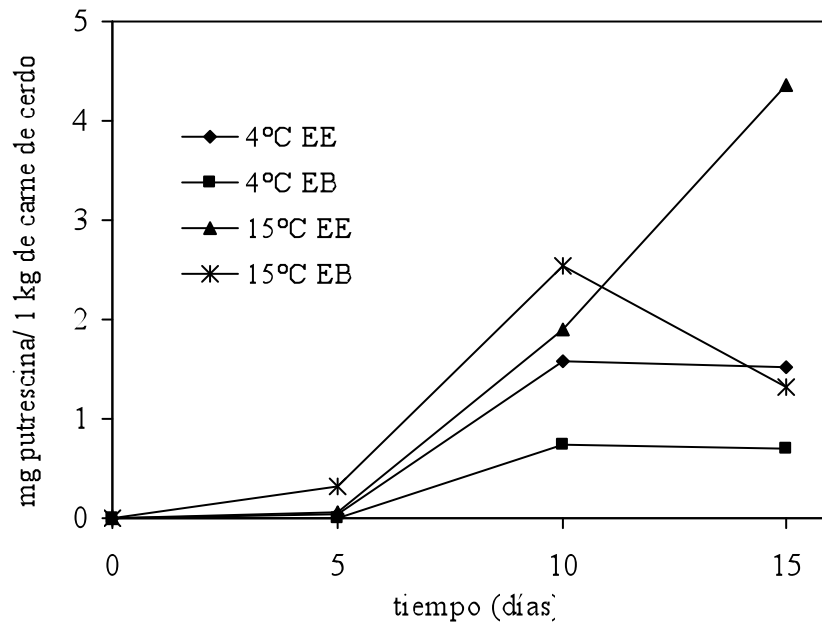


Figura 27. Concentración de putrescina en carne de cerdo

Tanto en carne de cazón como de cerdo, la concentración de putrescina tuvo diferencias significativas por efecto del tiempo, temperatura y tipo de enzima ($P < 0.001$) (Anexos V y VII). En todos los casos, la concentración de putrescina aumentó con el tiempo (Anexos VI y VIII).

La formación de la putrescina en carne de cazón aumentó significativamente ($P > 0.001$) con respecto a la temperatura empleada, ya que los valores medios de las muestras almacenadas a 15°C se obtuvieron los mayores más altos (1.278 mg/kg) que a 4°C (1.032 mg/kg). Éste resultado obtenido coincide con los obtenidos por muchos autores (Bauer y col., 1994; Byun y col., 2000; Bover-Cid y col., 2001; Du y col., 2002; Chytiri y col., 2004; Paleologos y col., 2004; Yongsawatdigul y col., 2004) en los que reportan un efecto de la temperatura sobre la concentración de putrescina cuando la carne es almacenada a temperaturas arriba del punto de congelación.

En cuanto al tiempo de estudio, la concentración de putrescina tuvo comportamiento ascendente (0, 5.791, 1.269 y 2.774 mg/ kg, a 0, 5, 10 y 15 días, respectivamente). Byun y col. (2000) reportaron una relación entre que la población en psicrótrofos y las concentraciones de putrescina debido a que los psicrótrofos tienen un metabolismo glucolítico usando como sustrato la glucosa y la glucosa 6 fosfato, sin embargo el bajo contenido de éstos en la carne hace que las bacterias psicrótrofas utilicen a los aminoácidos para así formar compuestos con olores putrefactos y sulfurosos. Así la concentración de putrescina probablemente está relacionada con la cuenta total de psicrótrofos ya que la población de psicrótrofos tuvo un comportamiento ascendente con respecto al tiempo de almacenamiento (0, 1.27, 2.85, 4.31, a 0, 5, 10 y 15 días respectivamente).

En la carne de cerdo, la comparación de los valores medios en los días de almacenamiento, la concentración de putrescina tuvo cambios significativos con respecto al tiempo de almacenamiento (0, 1.114, 1.692, 1.975 mg/kg, a 0, 5, 10 y 15 días). Lo cual también está relacionado con la cuenta total de psicrótrofos en la carne de cerdo.

Al igual que en la carne de cazón, en la comparación de los valores medios entre temperaturas, la concentración de putrescina de carne de cerdo tuvo mayor valor a 15°C (1.313 mg/ kg) que a 4°C (0.5768 mg/ kg), coincidiendo con los valores obtenidos por algunos autores (Paleologos y col., 2004; Yongsawatdigul y col., 2004).

En la comparación de los valores medios de concentración de putrescina entre las especies, tuvo los valores más altos en las muestras de cazón (1.155 mg/kg) (Anexo X) que en el cerdo (9.449

mg/kg) (Anexo X). De igual forma, en la presente tesis se encontró un crecimiento paralelo de la putrescina con el aumento de la población de psicrótrofos, siendo más evidente en cazón debido a la diferencia significativa en población de psicrótrofos en cazón que en cerdo (Anexo X).

En la comparación de los valores medios de la concentración de putrescina entre las especies, la concentración de putrescina fue mayor para el tratamiento exógeno (1.078 mg/ kg) y menor para el tratamiento endógeno (1.022 mg/kg) Anexo X. Éstos resultados de la concentración de putrescina representan un aumento en la disponibilidad de cantidades suficientes de arginina para la formación de putrescina, lo que hace pensar que la enzima EB actúa sobre éste aminoácido mayoritariamente que las enzimas endógenas.

Los resultados de las concentraciones de cadaverina y putrescina tuvieron concordancia con los resultados de Dainty y col. (1986) y Halász y col. (1994) en el sentido que en carne cruda, la concentración de cadaverina es mayor que la de putrescina en ambas especies (Anexos VI y VIII)

Triptamina

Las figuras 28 y 29 muestran la concentración de triptamina a lo largo del tiempo de estudio.

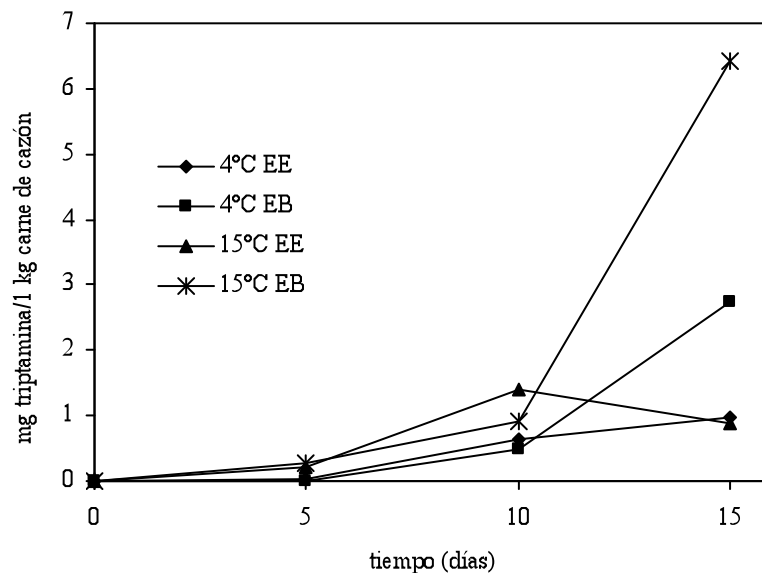


Figura 28. Concentración de triptamina en carne de cazón

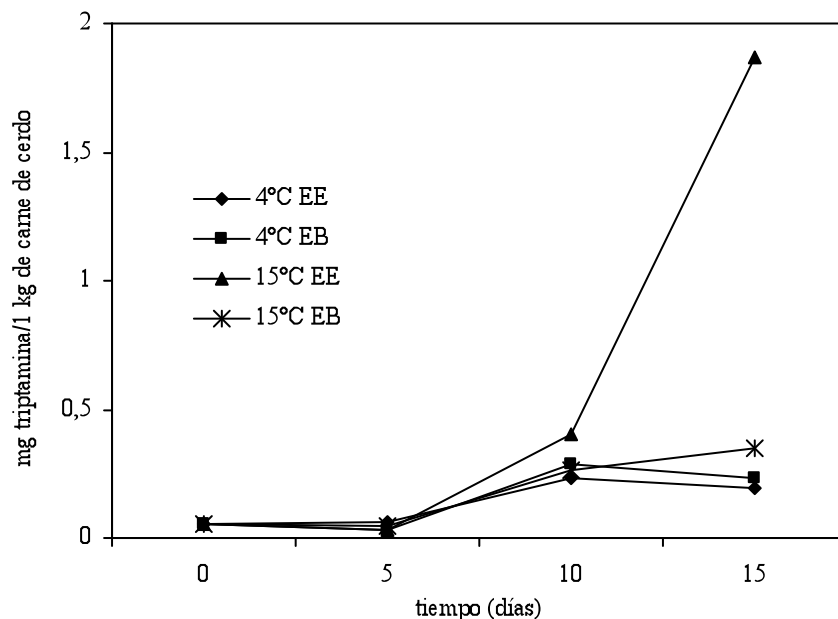


Figura 29. Concentración de triptamina en carne de cerdo

Se observó que el efecto de la temperatura tuvo diferencias significativas en la concentración de triptamina en carne de cazón (0.3835 y 1.496 mg/kg a 4 y 15°C) (Anexo VI), y en la de cerdo (1.431 y 0.3826 mg/kg a 4 y 15°C respectivamente) (Anexo VIII), lo que indicó también un efecto de la especie, siendo mayor en el cazón que en cerdo (0.9401 y 0.262 mg/kg en cazón y cerdo, respectivamente) (Anexo X). Izquierdo y col. (2004) relacionan la producción de triptamina con la población de enterobacterias tales como *Morganella morganii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei* etc., debido a la descarboxilación del triptófano. Lo anterior está relacionado con los valores obtenidos en la cuenta total de enterobacterias ya que fue mayor en el cazón que en cerdo (Anexo X). Lo cual, también sustenta los valores encontrados al comparar la concentración de triptamina entre especies, ya que el cazón tuvo mayor concentración (0.940 mg/kg) que el cerdo (0.2629 mg/kg) Anexo X.

Trimetilamina

La trimetilamina (TMA) solo es detectada en muestras de animales marinos, por lo que solo se determinó en carne de cazón, y no se encuentra en especies marinas vivas. Ésta amina, es el resultado de la reducción del óxido de trimetilamina (OTMA), mediante el enzima óxido trimetil

amino reductasa (OTMA–reductasa). La TMA es muy volátil y es asociada con el olor característico de descomposición del pescado (Krzymien y Elías, 1990; Seibel y Waals, 2002).

La figura 30 muestra la concentración de TMA en muestras de cazón a lo largo del tiempo de estudio.

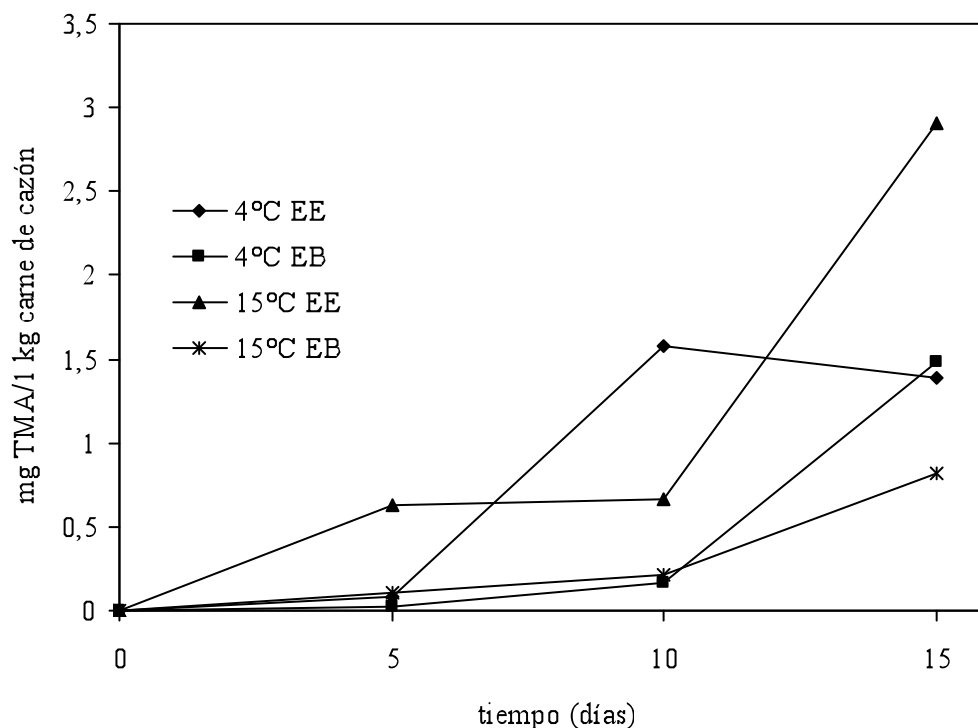


Figura 30. Concentración de TMA en carne de cazón

En todos los casos, hubo aumento en la concentración de TMA (figura 30)

Todas las fuentes de variación dieron diferencias significativas ($P > 0.001$) (Anexo V y VI). Éstos resultados concuerdan con el hecho que la TMA en el pescado fresco se encuentra en cantidades muy pequeñas y se acumula durante el deterioro (Huss, 1995).), por lo que se puede concluir que el aumento en la carga microbiana sería uno de los indicadores de la formación de TMA, ya que varios géneros bacterianos tales como *Alteromonas*, *Photobacterium* y *Vibrio* son capaces de reducir el OTMA a TMA (Regeinstein y col., 1982; Huss, 1995).

Se observó una relación entre la formación de TMA y el pH medio; el pH óptimo de actividad de la enzima OTMA-reductasa y la subsecuente formación de TMA es entre 7.2 y 7.4 (Soudan, 1965). De acuerdo a lo anterior y considerando el pH del cazón durante el almacenamiento (5.77, 6.41, 7.40, 7.75, a 0, 5, 10 y 15 días, respectivamente) las muestras almacenadas tuvieron actividad de la enzima responsable de la formación de TMA.

Por otro lado el efecto de la temperatura tuvo diferencias significativas con respecto a la concentración de TMA, ya que ésta aumenta significativamente: 0.665 mg/kg a 15°C y 0.568 mg/kg a 4°C (Anexo VI).

Como era de esperarse, el tratamiento también afectó a la concentración de TMA, observándose mayores concentraciones en muestras inmersas en la EB (1.124 mg/kg) que las muestras expuestas a enzimas endógenas (0.0755 mg/kg), esto indicaría probablemente que la enzima de *Pseudomonas* es capaz de reducir el OTMA a TMA.

6.3. Extracto proteico

6.3.1 Propiedades de emulsificación

Capacidad de formación de emulsión

Las proteínas miofibrilares son conocidas como buenos emulsificantes debido a su estructura anfifílica, en el que la parte hidrofóbica se adsorbe al glóbulo de grasa, mientras que la parte hidrofílica se estabiliza en la fase acuosa, dando como consecuencia un decremento en la tensión superficial estabilizando así el sistema.

La determinación de la capacidad de formación de emulsión del extracto proteico es determinada como la cantidad de aceite que puede emulsionar una solución de proteína al momento en que invierte la emulsión. En ésta determinación el papel de las proteínas es muy importante debido a las interacciones que se presentan; proteína-proteína, proteína-agua, proteína-aceite.

Las figuras 31 y 32 muestran ésta variable de respuesta a través del tiempo de estudio

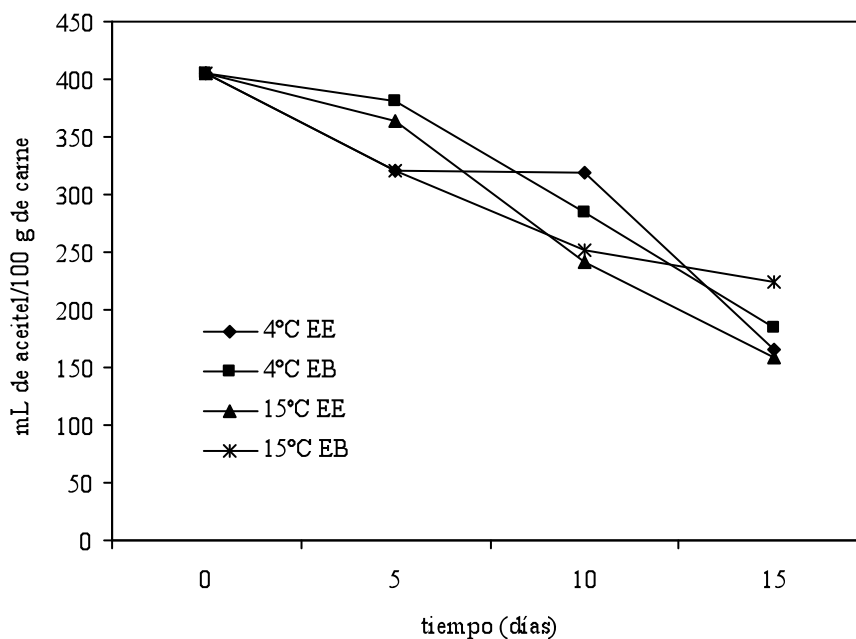


Figura 31. Capacidad de formación de emulsión de los extractos proteicos de carne de cazón

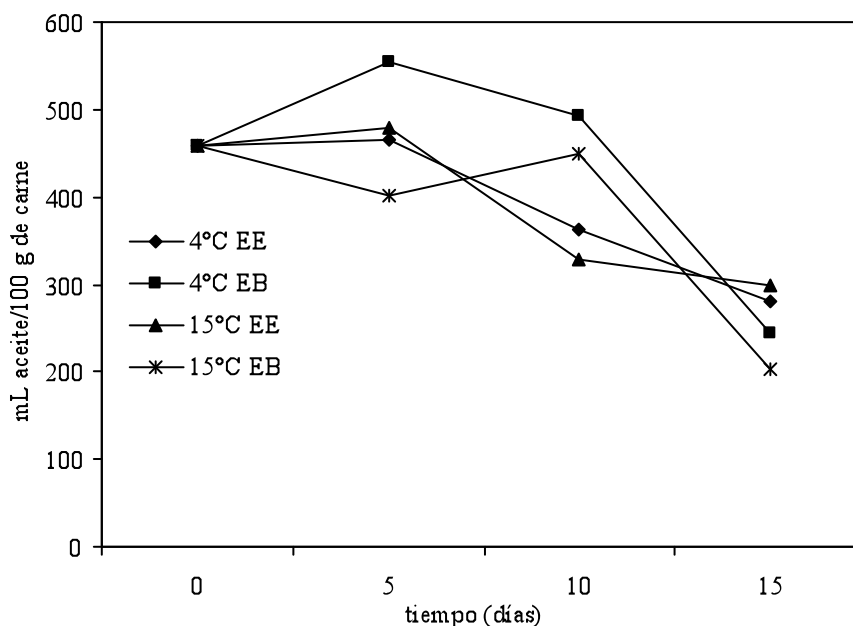


Figura 32. Capacidad de formación de emulsión de los extractos proteicos de carne de cerdo

Durante el tiempo de almacenamiento se observó un decremento en la capacidad de formación de emulsión, tanto a 4 como a 15°C, para ambas especies (figuras 31 y 32) (Anexos VI y VIII).

En la comparación de los valores medios de ésta propiedad entre las dos especies, se encontró que las proteínas de cerdo tuvieron mayor capacidad de emulsificar (399.934 mL aceite/100g carne) que las proteínas del cazón para cazón (302.174 mL aceite/100g carne) (Anexo X). Esto concuerda con lo reportado con Deng y col. (1981) ya que encontraron diferencias en la formación de emulsiones en especies de diferente habitat, marino y terrestre.

El efecto del tratamiento en las muestras de proteína miofibrilar de cazón, tuvieron diferencias significativas, ya que la media de los valores de la capacidad de formación de emulsión en la carne expuesta bajo tratamiento enzimático endógeno (EE) tuvo 297.375 mL aceite/100g carne, mientras que las proteínas miofibrilares extraídas de la carne tratada con la enzima bacteriana (EB) fue de 306.972 mL aceite/100g carne (Anexo VI).

En el caso de las proteínas miofibrilares de cerdo, éstos valores fueron de 392.005 mL aceite/100g carne y 407.813 mL aceite/100g carne, para EE y EB respectivamente (Anexo VIII). Observándose en ambas especies un mayor efecto de la EB en la emulsificación del aceite.

La comparación entre especies de los valores medios de la capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares por efecto del tiempo, mostraron un decremento a lo largo del estudio en ambas especies, 405, 346.41, 273.944, 183.33 mL de aceite /100g a 0, 5, 10 y 15 días, respectivamente para el cazón y 459.66, 475.66, 407.98, 256.41 mL de aceite /100g a 0, 5, 10 y 15 días para el cerdo. El decremento de la capacidad de emulsión en ambas especies pudo deberse al cambio estructural de la miosina, ocasionado por la actividad proteolítica, tanto endógena como exógena, evidente a través de electroforesis, ya que la miosina es catalogada como una proteína superficialmente activa (Dickinson y col., 1987; Morrissey y col., 1987; O'Neill y col., 1990).

Esto probablemente implica que una proteólisis controlada aumenta la capacidad de formación de emulsión y que al mismo tiempo disminuye cuando la proteólisis se intensifica con respecto al tiempo debido a la desnaturalización de las proteínas a cadenas polipeptídicas de menor peso molecular. Los resultados concuerdan con Mahmoud (1994), ya que propone que una hidrólisis extensa y no controlada produce pérdidas en la capacidad de emulsión

Índice de actividad de emulsión (IAE)

La determinación del índice de actividad de emulsión indica una aproximación sobre el valor del área interfacial creada por la proteína alrededor de los glóbulos de grasa (Pearce y Kinsella, 1978; Wagner, 2000).

El comportamiento del índice de actividad de emulsión (IAE) en cazón y cerdo es mostrado en las figuras 33 y 34. En todas las muestras estudiadas el IAE disminuyó con el tiempo de estudio.

Los valores medios del índice de actividad de emulsión de las proteínas miofibrilares extraídas de carne de cazón tuvieron diferencias significativas a lo largo del tiempo de estudio ($P < 0.0001$) (52.26, 35.91, 15.56, 7.51 m^2/g , al día 0, 5, 10 y 15, respectivamente) (Anexo V y Anexo VI). El IAE también tuvo diferencias entre las temperaturas de almacenamiento a 4 y 15 °C ($P < 0.0001$) (Anexo VI) con valores mayores a 4 que a 15°C (30.97 y 24.65 m^2/g , respectivamente). El efecto de la enzima tuvo diferencias significativas, el tratamiento con enzima bacteriana tuvo menor valor de área interfacial que las enzimas endógenas (25.89 y 29.73 m^2/g , respectivamente).

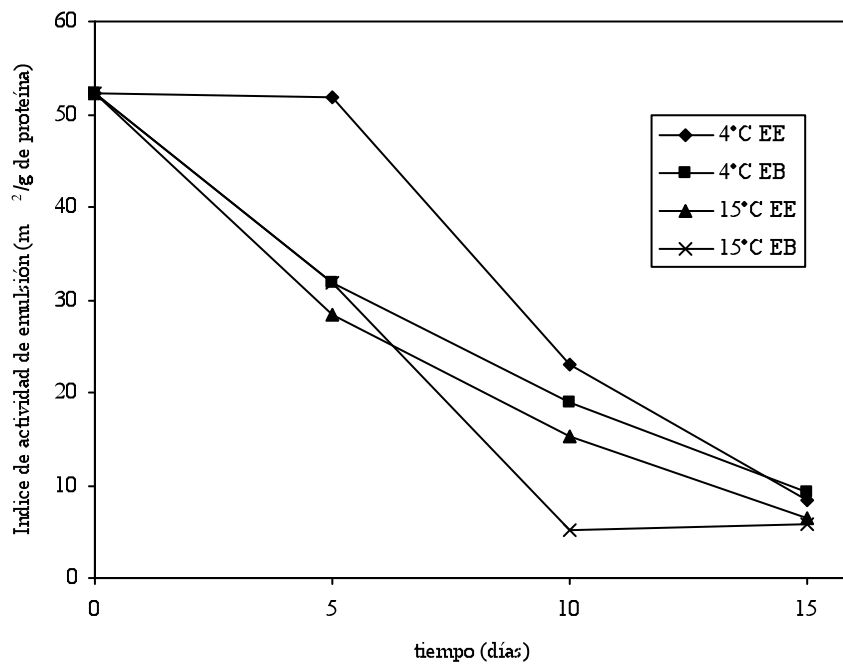


Figura 33. Índice de actividad de emulsión de los extractos proteicos de carne de cazón

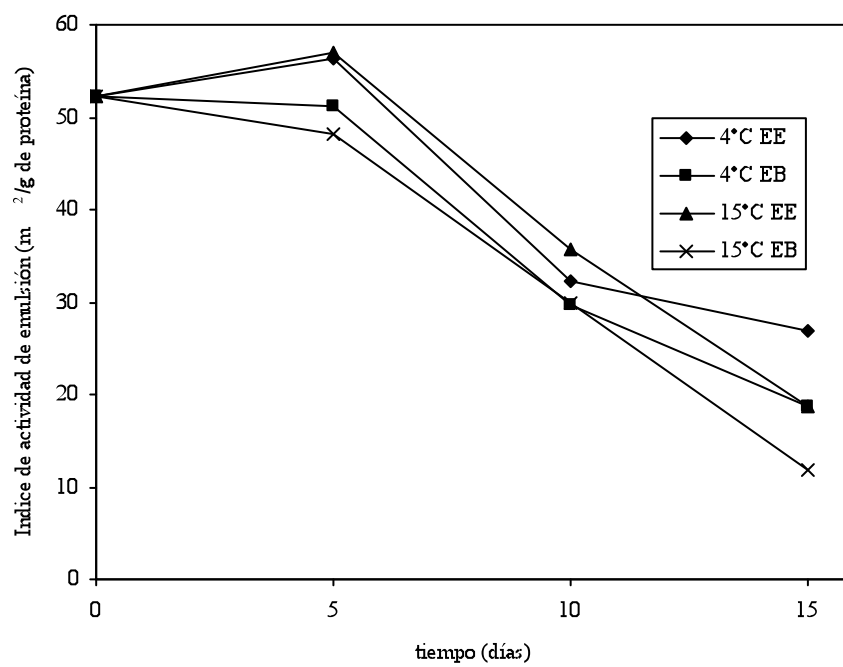


Figura 34. Índice de actividad de emulsión de los extractos proteicos de carne de cerdo

Los valores medios del índice de actividad de emulsión de las proteínas extraídas de carne de cerdo tuvieron diferencias significativas con respecto al tiempo de almacenamiento siendo mayor al inicio del estudio y menor al final (53.18, 52.16, 31.89 y 19.05 m²/g, al día 0, 5, 10 y 15 respectivamente) (Anexo VII). El efecto de la temperatura tuvo diferencias significativas (Anexo VII), siendo mayor a 4°C que a 15 °C (39.93 y 38.21 m²/g, respectivamente).

El efecto del tratamiento tuvo diferencias significativas, obteniendo el mayor valor las enzimas endógenas (41.427 m²/g), y menor valor las muestras tratadas con la enzima bacteriana (36.72 m²/g). Quizá éste hecho probablemente esta relacionado con la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, ya que las enzimas endógenas presentaron menores valores medios de actividad proteolítica por lo que las proteínas no sufrieron una alta degradacion como la encontrada por efecto de la enzima bacteriana

La comparación de los valores medios entre las especies mostraron diferencias significativas siendo mayor el área interfacial formada por las proteínas extraídas de carne de cerdo (32.47 m²/g) y menor para las proteínas de cazón (27.81 m²/g). Como era de esperarse, el efecto de la temperatura presento valores mayores en el área interfacial a 4°C que a 15°C (35.45 y 31.43 m²/g) y el efecto del tratamiento fue mayor el área formada con las enzimas endógenas (35.58 y 31.30 m²/g).

Al parecer el efecto del tratamiento y la temperatura estan probablemente relacionados con la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, ya que las enzimas endógenas presentaron menores valores medios de actividad proteolítica por lo que las proteínas no sufrieron una alta degradación como la encontrada por efecto de la enzima bacteriana, viéndose reflejado en los electroforetogramas de la sección 6.3.3

Al relacionar los valores del IAE con los valores de la determinación del tamaño de partícula y en el análisis de los glóbulos por microscopía óptica y de barrido de electrones, indican que el índice de actividad de emulsión está relacionado con el tamaño del glóbulo de aceite formado ya que a menores valores de área interfacial mayor es el radio de las partículas. Lo cual concuerda con lo propuesto por Waniska y col., 1981, quienes relacionaron el área interfacial con la distribución

del tamaño de partícula durante la elaboración de una emulsión modelo con la albúmina bovina a diferentes tiempos de homogenizado.

Estabilidad de la Emulsión

La estabilidad de emulsión está determinada por la capacidad de los glóbulos de grasa y la película proteica en la interfase para evitar la coalescencia, floculación o cremado (Damodaram, 2005; Robins y col, 2002; Walstra, 1996b). Las figuras 35 y 36 muestran el decremento de la estabilidad de la emulsión formada a partir de proteínas miofibrilares de cazón y cerdo. En ambos casos, la actividad proteolítica y la subsiguiente degradación proteica produjo una emulsión menos estable.

En muestras de cazón, la comparación de los valores medios de la estabilización de la emulsión tuvo diferencias significativas con respecto al tiempo y tratamiento enzimático ($P < 0.001$), pero no con respecto a la temperatura ($P > 0.085$) (Anexo V).

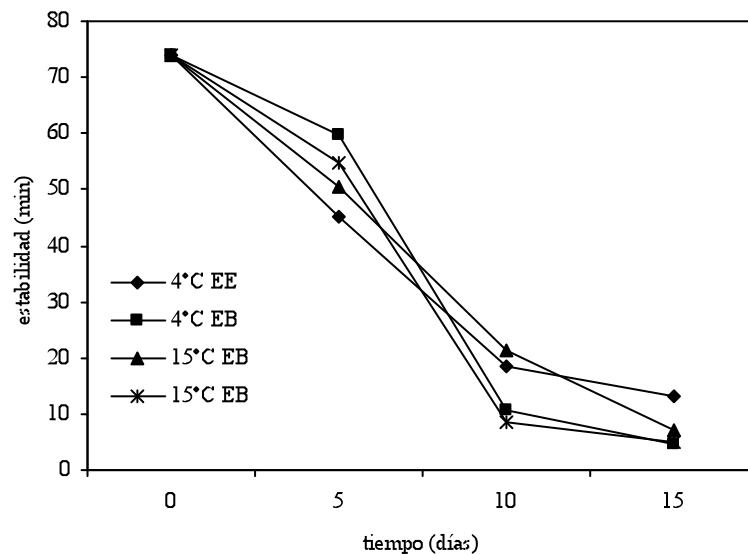


Figura 35. Estabilidad de emulsiones formadas por los extractos proteicos de carne de cazón

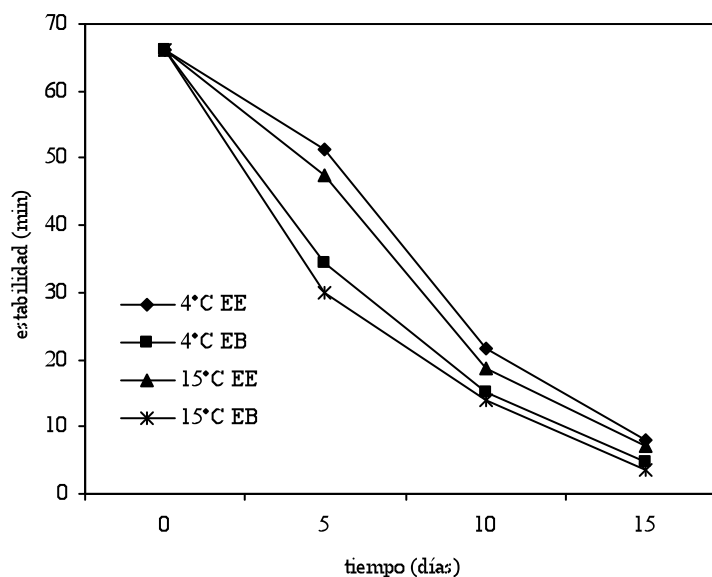


Figura 36. Estabilidad de emulsiones formadas por los extractos proteicos de carne de cerdo

En el caso de proteínas de cerdo, todas las fuentes de variación causaron diferencias significativas (Anexo VII).

La comparación de los valores medios de estabilidad del efecto del tratamiento enzimático en ambas especies, fue mayor en las proteínas miofibrilares extraídas de carne expuestas a proteólisis endógena que con enzima bacteriana (37.91 y 36.41 min, respectivamente en cazón; 35.75 min y 29.208 min, respectivamente para cerdo) (Anexo V y VIII). Al relacionar estos valores de estabilidad con los valores de la actividad enzimática por efecto del tratamiento (Sección 6.2.1), reflejan que a mayor actividad protelítica menor estabilidad de emulsión, debido a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares.

El efecto de la temperatura también tuvo diferencias significativas sobre los valores medios de la estabilidad de emulsión, al ser comparadas las dos temperaturas de almacenamiento. Las proteínas miofibrilares de las muestras almacenadas a 4°C presentaron mayor estabilidad (37.45 y 33.375 min en cazón y cerdo respectivamente) que las proteínas de muestras almacenadas a 15°C (36.875 y 31.583 min en cazón y cerdo respectivamente) (Anexo V y VIII). Lo que probablemente se puede deducir que a menores temperaturas de almacenamiento, mayor estabilidad de emulsión. Por otro lado, los valores menores de estabilidad encontrados a 15°C

pueden ser ocasionados por la población microbiana que presentaron las muestras almacenadas, donde las ufc de enterobacterias y psicrotrofos fueron mas altos; y que conjuntamente con las enzimas presentes tanto endógenas y la bacteriana, las cuales utilizan como sustratos a las proteínas miofibrilares ocasionando la desnaturalización y la subsecuente funcionalidad de éstas observándose en la desestabilización del sistema.

En la comparación de la estabilidad de las proteínas del cazón y cerdo, las del cazón presentaron mayor estabilidad de emulsión (37.16 min) que las formadas con proteína de cerdo (32.49 min) (Anexo X), dando a entender que probablemente las proteínas hidrolizadas de origen marino presentan mayor estabilidad que las de origen terrestre, sin embargo se ven limitadas en la capacidad de ligar grasa debido al bajo volumen de agente lipídico emulsionado. Además de que probablemente está relacionado con la actividad enzimática encontrada en el cazón, la cual fue mayor que en el cerdo, por lo que la alta producción de péptidos de bajo peso molecular del cazón son mas estables, debido a que se adsorben y se difunden mas rápidamente que las proteínas de alto peso molecular (Turgeon y col., 1991; Wilde y col., 2004).

6.3.2 Viscosidad aparente

La viscosidad de extractos proteicos está relacionada con los cambios estructurales; algunos autores han considerado a la viscosidad como un indicativo en la calidad funcional de la carne de pescado (Borderías y col, 1985; Barroso y col., 1998).

El comportamiento de la viscosidad de las soluciones de proteínas miofibrilares aisladas de la carne de cazón y cerdo se presenta en las figuras 37 y 38.

Los valores de la viscosidad aparente de las soluciones de proteína de cazón y cerdo aumentó con el tiempo de estudio, éste efecto fue más marcado en las muestras almacenadas a 15°C que a 4°C. La comparación de los valores medios de la viscosidad del extracto proteico miofibrilar de cazón mostró diferencias a lo largo del tiempo de estudio ($P < 0.001$) (Anexo V y Anexo VI). Así mismo la comparación de los valores medios en el efecto de la temperatura de almacenamiento mostraron diferencias entre 4 y 15 °C ($P < 0.001$) (Anexo VI) con valores más altos a 15 que a 4 °C (28.002 y 20.120 Pa·s, respectivamente). Mientras que el tratamiento enzimático con enzima bacteriana no tuvo efecto significativo en cazón ($P > 0.066$) (Anexo V), pero si en cerdo ($P > 0.001$) (Anexo VII).

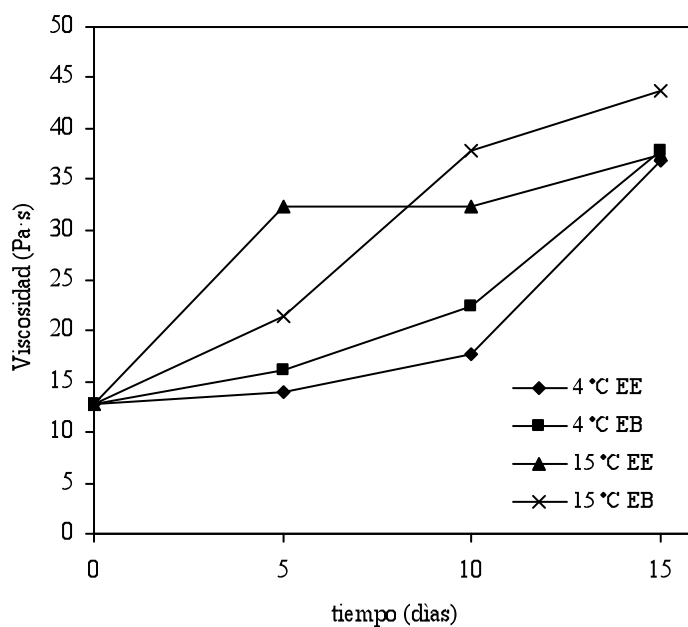


Figura 37. Viscosidad aparente de los extractos proteicos de carne de cazón

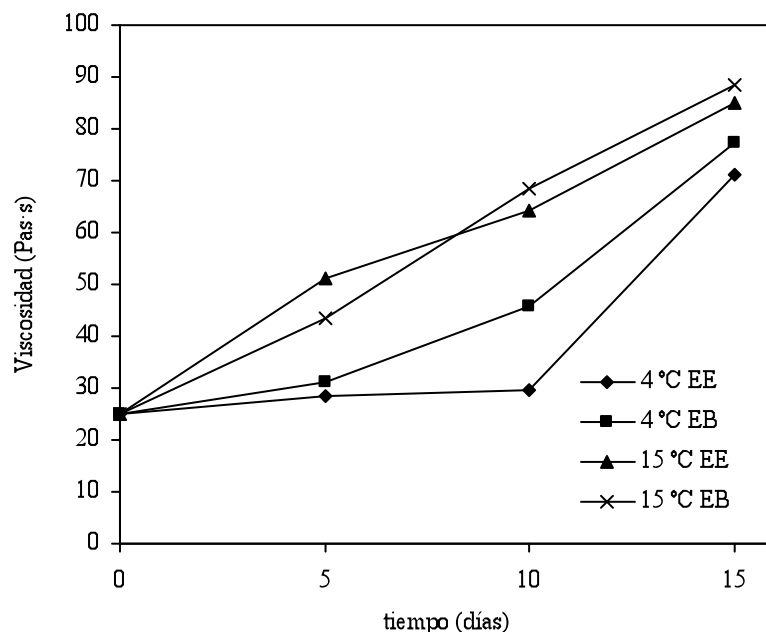


Figura 38. Viscosidad aparente de los extractos proteicos de carne de cerdo

La viscosidad de las proteínas miofibrilares extraídas de la carne de cerdo, tuvo diferencias significativas durante el tiempo ($P < 0.001$) (Anexo VII y VIII).

La comparación de los valores medios de la viscosidad de las proteínas de cerdo en el efecto de la temperatura se observaron diferencias significativas entre las temperaturas ($P < 0.001$) (Anexo VII), obteniendo valores mayores a 15°C que a 4°C (56.3613 y 41.6925 Pa·s, respectivamente) (Anexo VIII).

El efecto del tratamiento enzimático sobre la comparación de los valores medios de viscosidad tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$), obteniendo el mayor valor el tratamiento de enzima bacteriana (50.57.58 Pa·s) que con enzima endógena (47.477 Pa·s).

Finalmente, la viscosidad aparente en cerdo fue significativamente mayor ($P > 0.001$) que en cazón (49.0269 y 24.0607 Pa·s, respectivamente). Éste hecho se debe probablemente a que algunos autores han reportado diferentes niveles de funcionalidad entre especies de animales (Cofrades y col., 1993) ya que se han mostrado diferentes grados de interacción intermolecular entre especies terrestres y marinas, aunado a esto la naturaleza de las proteínas (Cofrades 1994; Barroso y col., 1998). Lee y Rha (1979) han propuesto que las proteínas tienen interacciones

moleculares, por lo tanto algunas propiedades moleculares como la hidratación y el volumen molecular aumenta, dando como consecuencia la formación de sistemas más viscosos. Se ha sugerido que las especies terrestres son más apropiadas para producir este tipo de estructuras que las marinas (Cofrades, 1994, Jiménez-Colmenero y Borderías, 1983), probablemente en esto se fundamenta el hecho de que las proteínas miofibrilares de cerdo tuvieron mayor viscosidad que las proteínas del cazón.

Probablemente la viscosidad aumentó por la acción enzimática que modificó a la estructura proteica. Cofrades y col. (2003) reportaron que los incrementos que se observan en la viscosidad de pastas cárnicas, son un resultado de la actividad enzimática, modificando así la interacción proteína-grasa y proteína-agua, además de que se modifican las condiciones que estabilizan a las proteínas, tales como el aumento de cargas negativas por un aumento de pH y como consecuencia el reacomodo molecular de las proteínas más abundantes, como la miosina y la actina (Liu y col., 1996; Chen y col., 1989).

6.3.3 *Análisis moleculares*

Grupos sulfhidrilo totales

Los grupos sulfhidrilo (SH) y los puentes disulfuro (SS) son importantes para mantener la estructura nativa de las proteínas, influyendo significativamente en las propiedades funcionales de éstas (Genovese y col., 2000) siendo también los que determinan un papel importante en la formación de estructuras rígidas como en la formación de geles. La estabilización de una emulsión por proteínas, depende de la desnaturalización y reacomodo en la interfase aceite-agua y además de la habilidad de formar una película viscoelástica en la interfase (Damodaran y Anand., 1997; Dickinson y Matsumura, 1991).

La concentración de grupos sulfhidrilo en los extractos proteicos es mostrado en las figuras 39 y 40.

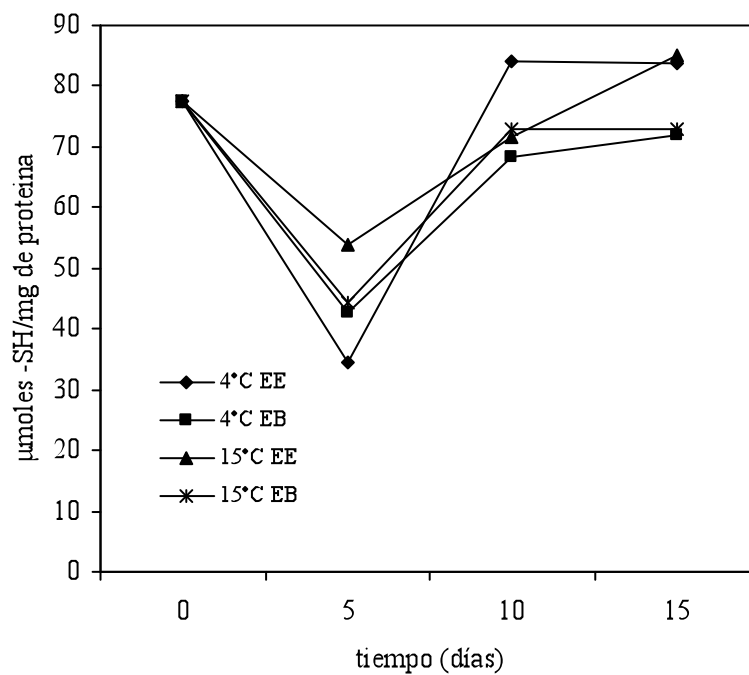


Figura 39. Concentración de grupos sulfhidrido en los extractos proteicos de músculo de cazón

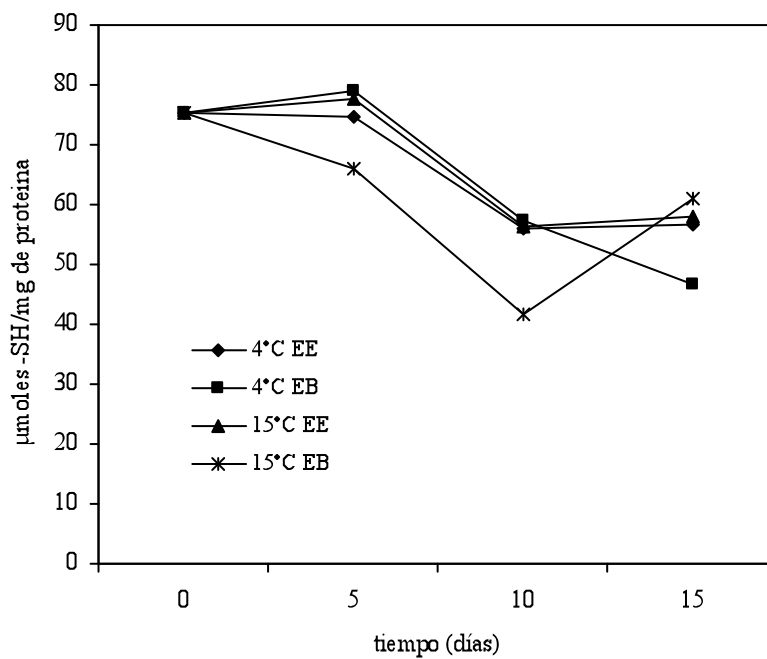


Figura 40. Concentración de grupos sulfhidrido en los extractos proteicos de músculo de cerdo

En todos los tratamientos, la concentración de grupos –SH de las proteínas miofibrilares de cazón, disminuyó al día 5 (figura 39) con un aumento posterior al día 10. El aumento posterior ocurrido en las proteínas miofibrilares de cazón podría ser el resultado del proceso gradual y acelerado en la desnaturalización de las proteínas del cazón, debido a la acción de las proteasas endógenas y a procesos bioquímicos, los cuales caracterizan a los animales marinos como autolíticos (Cheret y col., 2007, Visessaguan y An., 2001), donde los enlaces SS intermoleculares se pierden dando como consecuencia grupos SH expuestos.

En el caso de las proteínas miofibrilares de cerdo hubo una disminución en la concentración de grupos -SH a los 10 días (figura 40). El incremento y disminución en el número total de los grupos sulfhidrilo probablemente sea debida a la formación de puentes SS como consecuencia de los cambios conformacionales que ocurren durante el almacenamiento y viceversa (Ishioroshi y col., 1979)

El efecto de la temperatura en la comparación de los valores medios de la concentración de los grupos sulfhidrilo tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$) (Anexo V) en las proteínas miofibrilares de cazón (71.007 y 66.033 $\mu\text{moles /mg}$ proteína a 4°C y 15°C, respectivamente); en las proteínas de cerdo, el efecto de la temperatura de almacenamiento no tuvo efecto significativo (65.455 y 64.254 $\mu\text{moles /mg}$ proteína a 4°C y 15°C, respectivamente) (Anexo VII).

La concentración de grupos sulfhidrilo en las proteínas miofibrilares de cazón fue afectada significativamente ($P < 0.001$) por el tipo de tratamiento, ya que se obtuvieron valores significativamente diferentes, encontrándose valores más altos en las proteínas miofibrilares tratadas con la enzima bacteriana (EB) (69.49 $\mu\text{moles/mg}$) que con el tratamiento endógeno (EE) (67.54 $\mu\text{moles/mg}$). De forma opuesta, la concentración de grupos sulfhidrilo de la carne de cerdo tratada con enzima bacteriana tuvieron valores menores (63.123 $\mu\text{moles/mg}$) que las muestras tratadas con enzimas endógenas (66.587 $\mu\text{moles /mg}$).

Para explicar lo anterior, el primer caso donde el cazón tratado con EB tiene mayor producción de grupos SH se puede proponer que éste hecho está ligado con la actividad proteolítica endógena de los animales marinos que juntamente con la acción de EB cambian la forma estructural de las

proteínas, en éste caso los enlaces S-S a SH. Si se relacionan los resultados con la actividad proteolítica (Sección 6.2.1) se puede deducir que en el caso del cazón a mayor actividad proteolítica mayor número de grupos SH, debido probablemente a la proteólisis no controlada. Dando como consecuencia pérdida de la integridad de la proteína, ya que los enlaces SS son los que estabilizan a las proteínas, al existir un desequilibrio de estos se exponen con un átomo de H, para formar SH.

En el segundo caso donde el tratamiento de la EB en la carne de cerdo tuvo menor concentración grupos SH, fue quizá a que las enzimas endógenas, que actúan en la proteólisis de cerdo no tienen el mismo sitio de acción, ni actividad proteolítica que las proteasas encontradas en cazón, es decir diferencias entre el tipo de proteasas de acción, pese a que en ambas especies son endógenas, en el trabajo no se caracterizaron otro tipo de proteasas. Por otro lado, también la diferencia de pH del sistema cárnico pudiera estar involucrado, ya que la carne de cazón presentó mayor valor de pH que el cerdo dando como consecuencia una diferencia en la actividad de las enzimas endógenas.

La especie del animal determinó significativamente ($P > 0.001$) la concentración de grupos sulfhidrilo en las proteínas miofibrilares (68.520 y 64.855 $\mu\text{moles/mg}$, cazón y cerdo, respectivamente) (Anexo X), ésta diferencia se indica también en las figuras 37 y 38. Éste hecho puede estar relacionado con la actividad proteolítica de cada especie, ya que la proteólisis es más rápida en el cazón que en el cerdo, dando como consecuencia cambios en la conformación molecular y actividad superficial de las proteínas.

Modificación proteica

La figura 41 muestra el perfil electroforético de extractos proteicos de cazón y cerdo al inicio del estudio ($t = 0$).

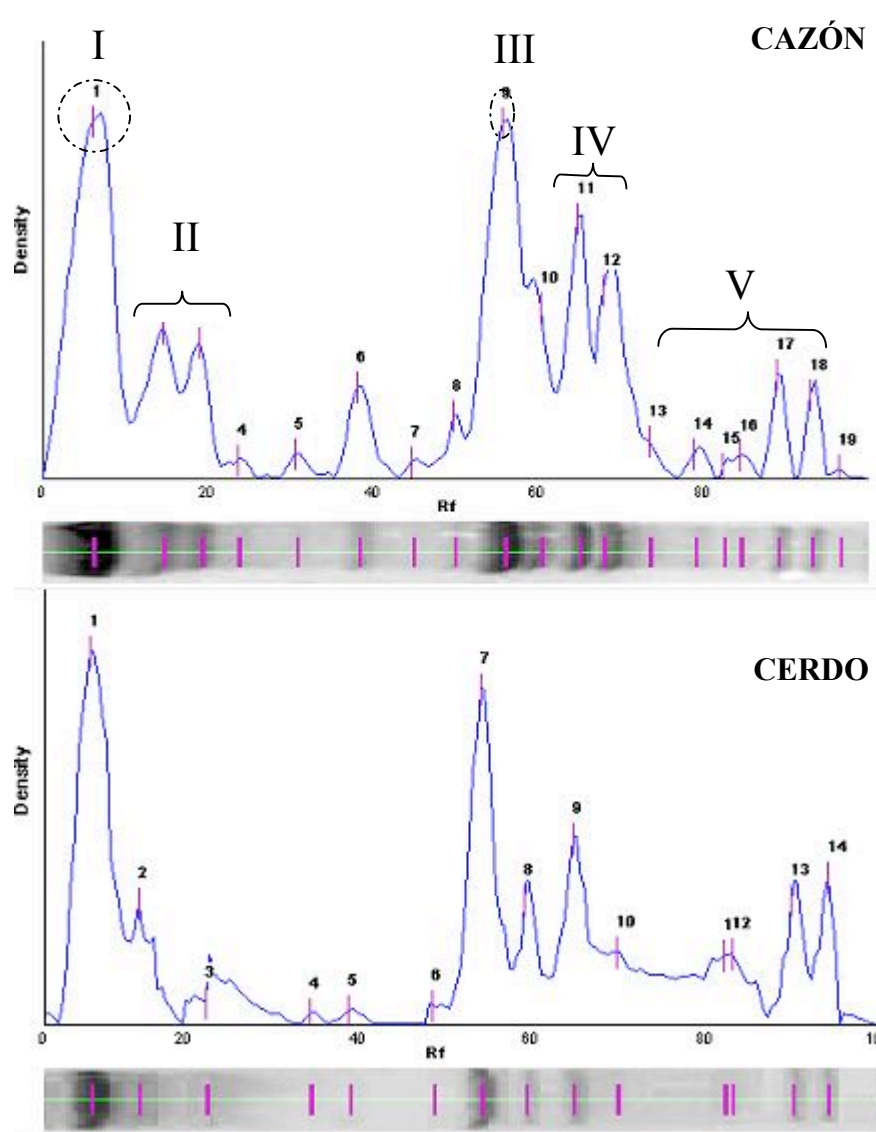


Figura 41. Electroforesis de los extractos proteicos de cazón y cerdo a tiempo = 0
 I. cadena pesada de miosina; II. actinina y otras proteínas; III. Actina; IV. tropomiosina y troponina T; V. cadenas ligera de miosina

Zona I. Se observó la banda más abundante con un peso molecular aproximado de 200 kDa, atribuida a la cadena pesada de la miosina. Algunos autores coinciden en que ésta proteína es la de mayor concentración en la zona I, con igual comportamiento en todas las especies (Nakai y Li-Chan, 1988; Susuki, 1981), lo que se corrobora en el presente estudio ya que no se encontraron diferencia entre el cazón y cerdo.

Zona II. Comprendida entre 195 y 100 kDa, tanto en cerdo como en cazón, se presenta un área de integración menor con respecto a la cadena pesada de la miosina. Se concluyó que en ésta zona se pueden encontrar proteínas tales como la proteína C (\approx 135 kDa), la α -actinina (\approx 95 kDa) y algunas cadenas de proteínas grandes como la titina y nebulina.

Zona III. Consta de una banda con un peso molecular aproximado de 45 kDa, posiblemente actina, la cual, junto con la miosina, son las proteínas más abundantes, la actina comprende el 20% del total de la proteína contenida en la miofibrilla. La actina, al igual que la miosina, no presentó diferencias entre el cazón y el cerdo, hecho también reportado por Seki y Arai. (1974) en actina purificada de carne roja y de pescado.

Zona IV. Ésta zona está comprendida después de la actina, corresponde a las proteínas tropomiosina-troponina, aparecen bandas en el intervalo de 34 a 37 kDa. Es de difícil observación en los densitogramas debido al traslape de las áreas formadas por varias proteínas. En ésta zona se encuentran la α - y la β -tropomiosina y la troponina T, la mayor de las 3 subunidades, con un peso molecular de alrededor 37 kDa. Pearson y Young (1989) reportaron que la proporción de troponina T es el doble en carne de cerdo en comparación con la carne de aves en la cual hay la misma proporción de las 3 subunidades de troponina. La proporción de la troponina y tropomiosina en la proteína total de la miofibrilla es de aproximadamente del 10 % (Cheret., 2005; Pearson y Young, 1989).

Zona V. Las proteínas encontradas en ésta zona tuvieron un peso molecular inferior a 30 kDa; podrían corresponder a troponina C (18-20 kDa), troponina I (20 kDa) y cadenas ligeras de la miosina. Éstas proteínas tienen pesos moleculares muy similares, por lo que también resulta difícil identificarlas separadamente en el electroforetograma; sus pesos moleculares varían entre

especies. Las cadenas ligeras de la miosina se encuentran entre 25.18 y 16 kDa, son diferentes entre especies terrestres y marinas, así como entre las mismas especies marinas (Skaara y Regenstein, 1990). Las diferencias de las proteínas miofibrilares entre especies radican en las proteínas encontradas en las fracciones inferiores a 45 kDa (An y col., 1989; Skara y Regenstein, 1990; Cofrades, 1994; Chen y Hwang, 2002).

Degradación de proteínas miofibrilares del cazón

Durante el almacenamiento de la carne de cazón se observaron cambios en los perfiles electroforéticos, principalmente por la presencia de bandas de bajo peso molecular durante todo el tiempo de estudio. Se observó mayor degradación proteica en las muestras de carne tratadas con tratadas con enzima bacteriana (EB) y almacenadas a 15°C por 15 días, evidente por el mayor número de bandas (Figura 42, carriles 10, 13 y 15), producto de la degradación de las cadenas pesadas de miosina, de actina, troponina, y tropomiosina, indicado por la disminución en la intensidad de las bandas a 205 kDa y 45 kDa. A la vez, se observó la aparición de bandas de peso molecular menor a 45 kDa. Las muestras de carne expuestas a proteólisis endógena (EE), también presentaron degradación, aunque con menor intensidad (Figura 40, carriles 9, 12 y 14). Las bandas de pesos moleculares menores a 45 kDa, probablemente fueron el resultado de la desnaturalización de las proteínas por la acción proteolítica endógena.

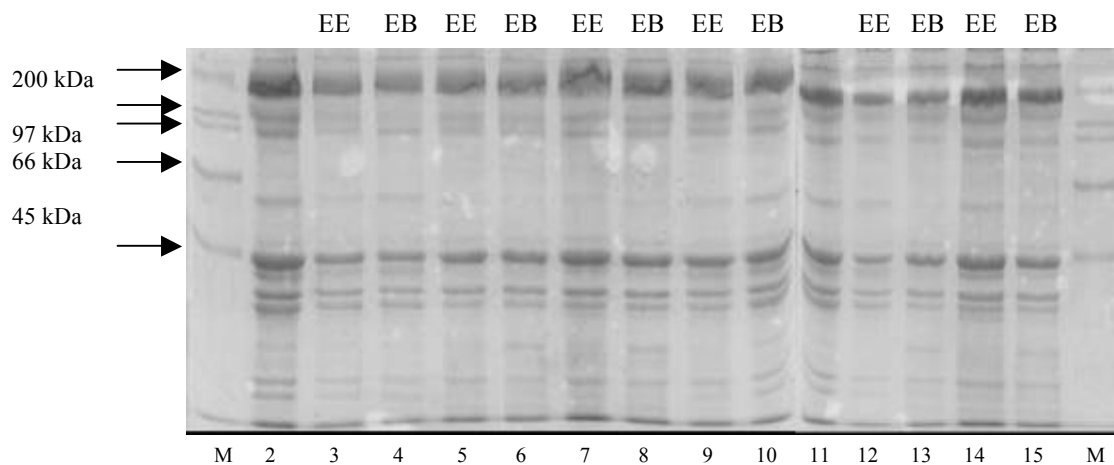


Figura 42 SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días
M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;
EB: efecto de enzima bacteriana
2 y 11: tiempo cero
3 y 4: 5 días (4°C) 9 y 10: 5 días (15°C)
5 y 6: 10 días (4°C) 12 y 13: 10 días (15°C)
7 y 8: 15 días (4°C) 14 a 15: 15 días (15°C)

Los densitogramas del comportamiento de las proteínas miofibrilares durante el estudio se muestran en la Figuras 43 y 44, observándose los cambios mencionados.

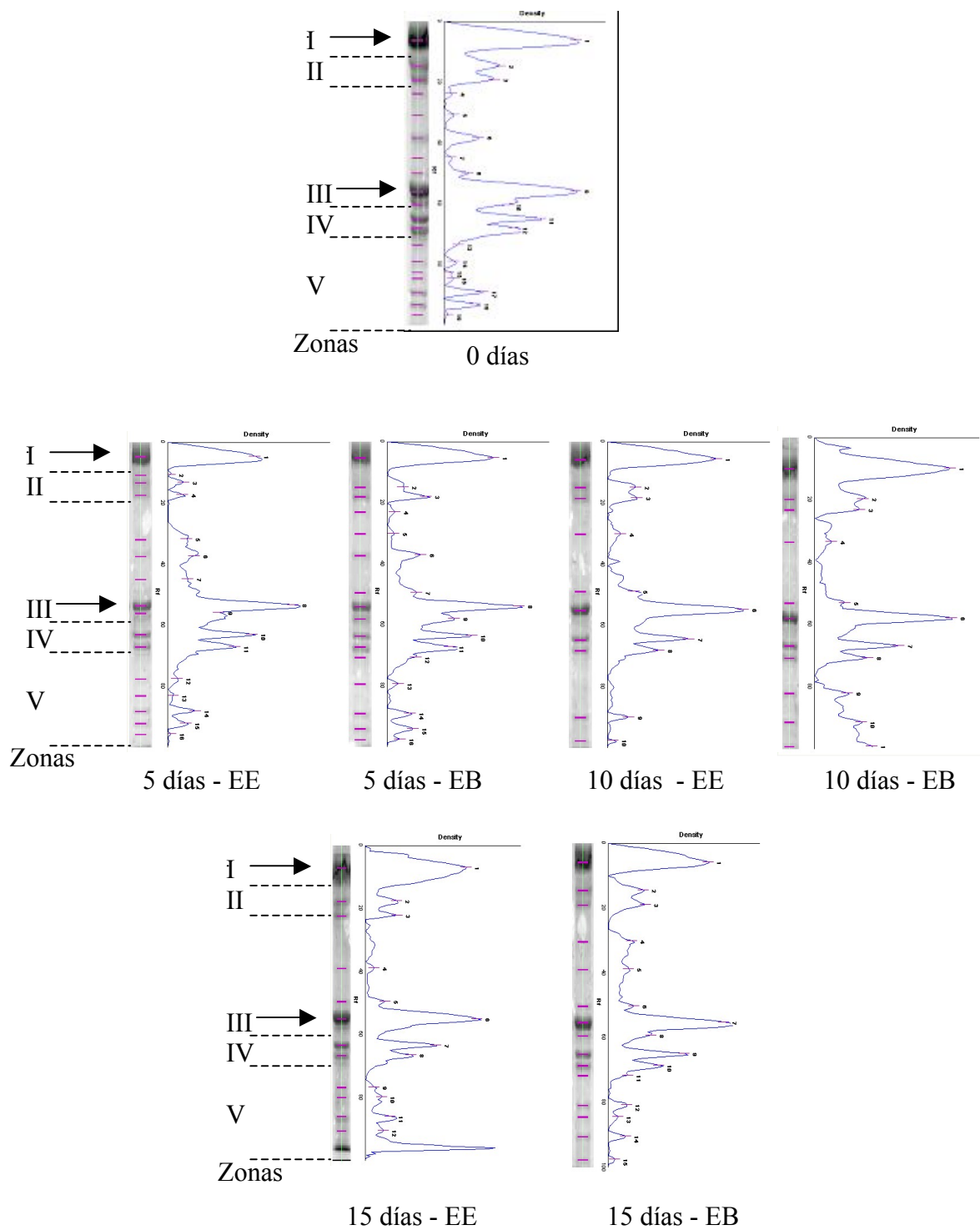


Figura 43. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días a 4°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana

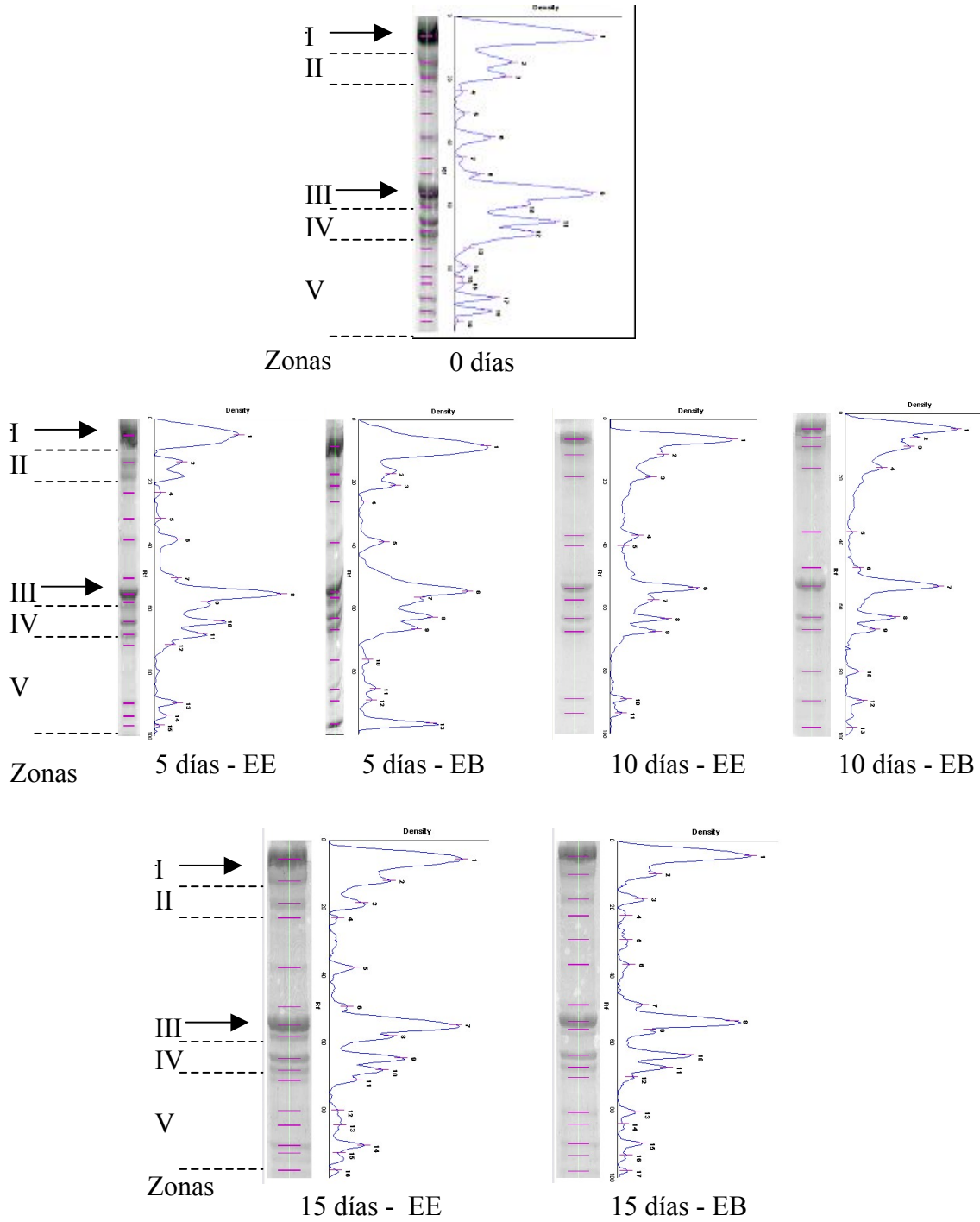


Figura 44. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón almacenadas por 15 días a 15°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana

En la degradación proteica presentada en la figura 43, la zona I comprendió una proteína de 200 kDa atribuida a la miosina. Se observó la variación de éste pico con respecto al tiempo cero en las muestras con tratamiento enzimáticos EE y EB, y en función de la temperatura. A 4°C se observó un aumento en el pico comprendido para ésta proteína al día 10, sin embargo al día 15 hubo una disminución en la densidad del pico. A 15°C el tamaño del pico de éste tratamiento mostró tener alta densidad de ésta área.

El efecto de enzimas endógenas, la intensidad de la miosina mostró tener un ligero aumento en el tamaño del pico tanto a 4 como a 15°C. Al parecer, los cambios en disminución de la intensidad de éste pico derivan de la desnaturalización de la miosina, y el incremento de la intensidad del pico a tiempos intermedios de estudio posiblemente deriva de la desnaturalización de proteínas de alto peso molecular por acción de proteasas endógenas. La literatura reporta degradación de proteínas de gran peso molecular (arriba de 200 kDa) tales como la titina y la nebulina, las cuales son utilizadas como sustratos del sistema proteolítico endógeno (Fritz y Greaser, 1991; Huff y col., 1991; Boles y col., 1992).

En la zona II, donde los polipéptidos encontrados oscilan en un intervalo de peso molecular entre 195 a 100 kDa, la degradación debida al tratamiento de enzimas endógenas (EE) y enzima bacteriana (EB) sugiere la presencia de residuos de miosina y proteínas de alto peso molecular (Boles y col., 1991), además de la probable degradación de la proteína C y la actinina, corroborado por la diferencia en los picos de la zona II y la III. La zona II fue mas intensa en las proteínas de las muestras tratadas con EB que con EE, y además que el análisis en el almacenamiento a 15°C obtuvo la acumulación de cadenas polipeptídicas en éste rango de peso molecular. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la actividad proteolítica de la carne tratada con enzimas endógenas (EE) y la enzima bacteriana (EB), ya que las primeras tuvieron menor actividad proteolítica (467.50 y 395.208 UAP pH 4 y 6) con respecto las muestras tratadas con enzima bacteriana (545.417, 1015.50 UAP a pH 4 y 6).

La zona III corresponde a la banda de actina de 45 kDa; se observó que ésta proteína no tuvo variación en cuanto a su intensidad en los tratamiento y en las temperaturas de almacenamiento,

lo cual no solo significa que la actina haya sido alterada molecularmente por la acción proteolítica de las enzimas, sino la acumulación de residuos de proteínas de alto peso molecular.

En la zona IV se localiza a la troponina y tropomiosina. Robson y Huiatt (1983) reportan que éstas proteínas son modificadas por acción enzimática, lo que concuerda con los resultados encontrados en éste trabajo, al observarse bandas de bajo peso molecular en la zona V. Aunque a pesar de lo propuesto anteriormente, para asegurar éste hecho se propone el análisis de éstas en forma pura.

En la zona V se observaron los cambios drásticos en nuestro estudio, ya que se obtuvieron picos derivados de la degradación de otras proteínas (cadenas ligeras de la miosina, actina, troponina y tropomiosina) además de la aparición de péptidos menores a 30 kDa. Se ha reportado que después de la etapa postmortem el primer cambio efectuado es la aparición de un componente de un peso aproximado a 30 kDa, y es atribuido a la acción de las calpainas sobre la troponina T (Di lisa y col., 1995; Cheret, 2005).

Los picos de ésta zona fueron mayores en las muestras expuestas a EB y 15°C debido a proteólisis acelerada; aunado a esto, hay que considerar el carácter autolítico del cazón, como especie de origen marino (Jiang, 2000; Visessaguan y An, 2001).

Degradación de proteínas miofibrilares del cerdo

Las proteínas miofibrilares de la carne de cerdo también presentaron degradación (Figura 45). Se observaron cambios en las proteínas de la zona II con pesos moleculares de 195 a 100 kDa, tanto a 4 como a 15°C. Se encontró también la presencia de péptidos menores a 45 kDa, producto de degradación de proteínas de mayor peso molecular, cuya concentración aumentó al incrementarse el tiempo de almacenamiento, posiblemente como consecuencia de la actividad proteolítica tanto endógena como exógena, comportamiento similar al observado en las muestras de cazón.

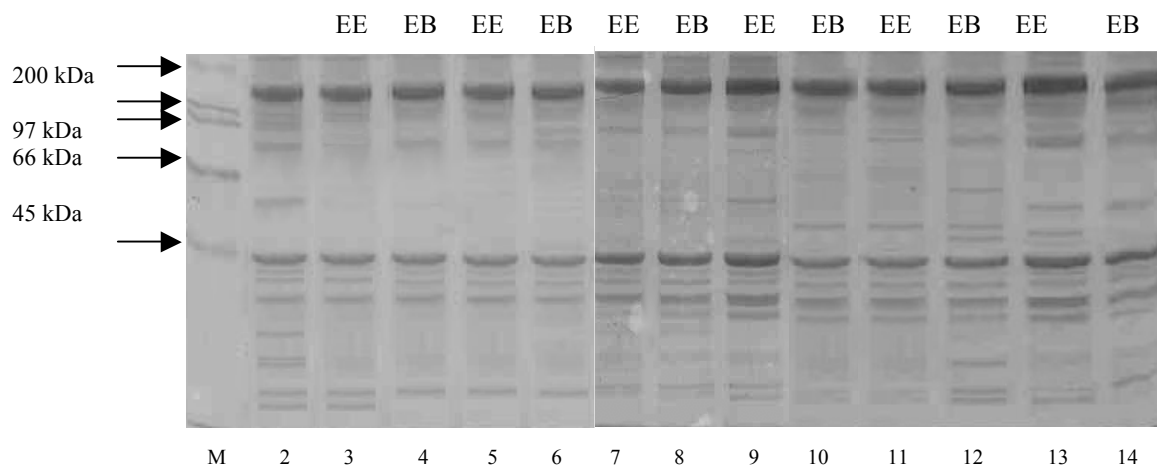


Figura 45. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días
 M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;
 EB: efecto de enzima bacteriana

2 y 11: tiempo cero

3 y 4: 5 días (4°C) 9 y 10: 5 días (15°C)

5 y 6: 10 días (4°C) 12 y 13: 10 días (15°C)

7 y 8: 15 días (4°C) 14 a 15: 15 días (15°C)

Los densitogramas correspondientes se muestran en las figuras 46 y 47. Se observaron cambios con respecto al tiempo, en las diferentes zonas I, II, III y IV.

En el pico observado en la zona I, correspondiente a miosina, se observó cambios no tan marcados a lo largo del tiempo de estudio, posiblemente debido a que hubo una degradación ligera sobre ésta proteína. En la zona II se encontraron 2 picos los que probablemente indicaron que la miosina pudo sufrir cierta degradación, evidenciada por la presencia de bandas de peso molecular menores a 205 kDa, las cuales aumentaron en intensidad a lo largo del estudio. Lo anterior está relacionado probablemente a que se ha reportado que las cadenas pesadas de la miosina (200 kDa) son sustrato de las catepsinas B, D, H y L (Cheret, 2005).

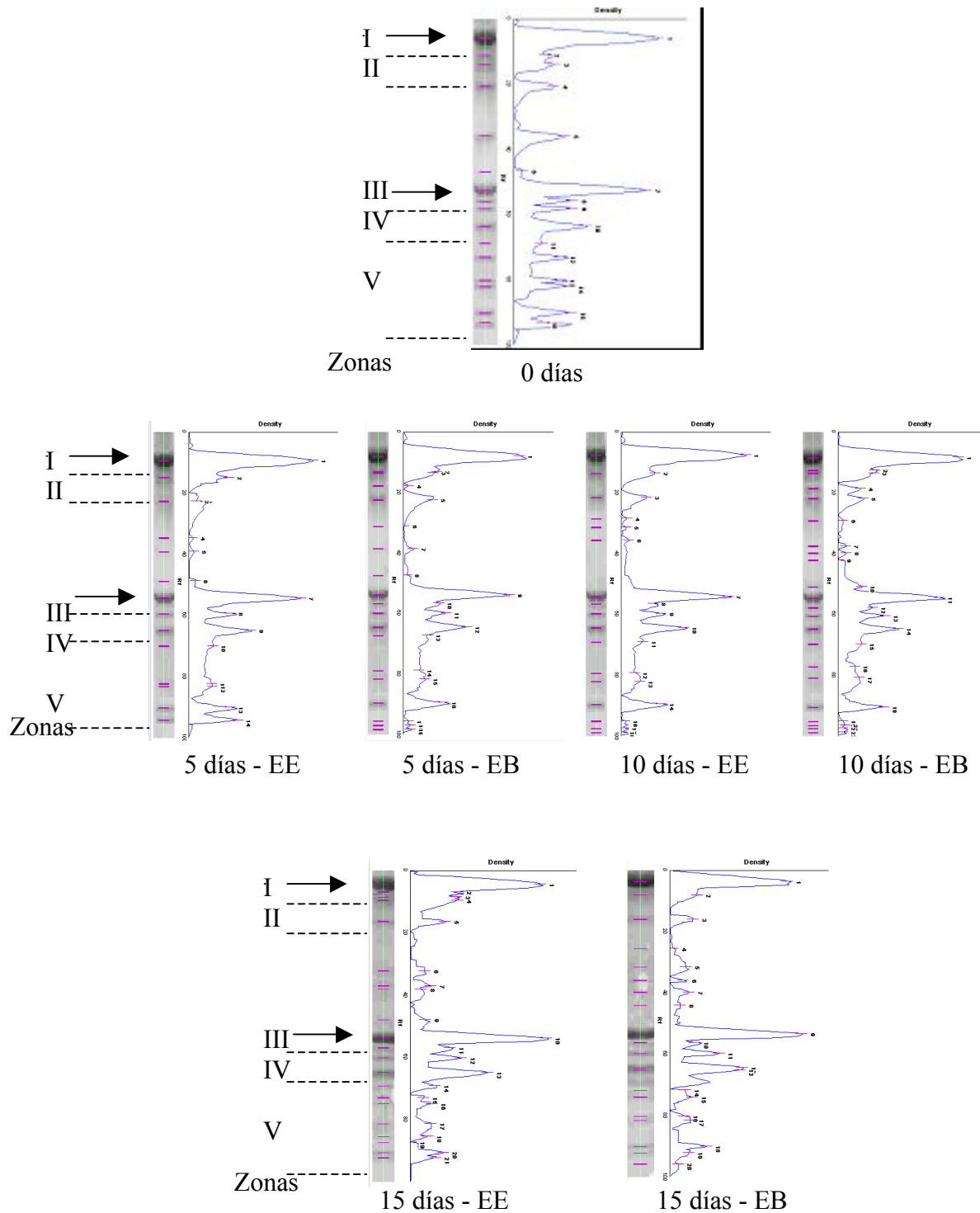


Figura 46. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días a 4°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana

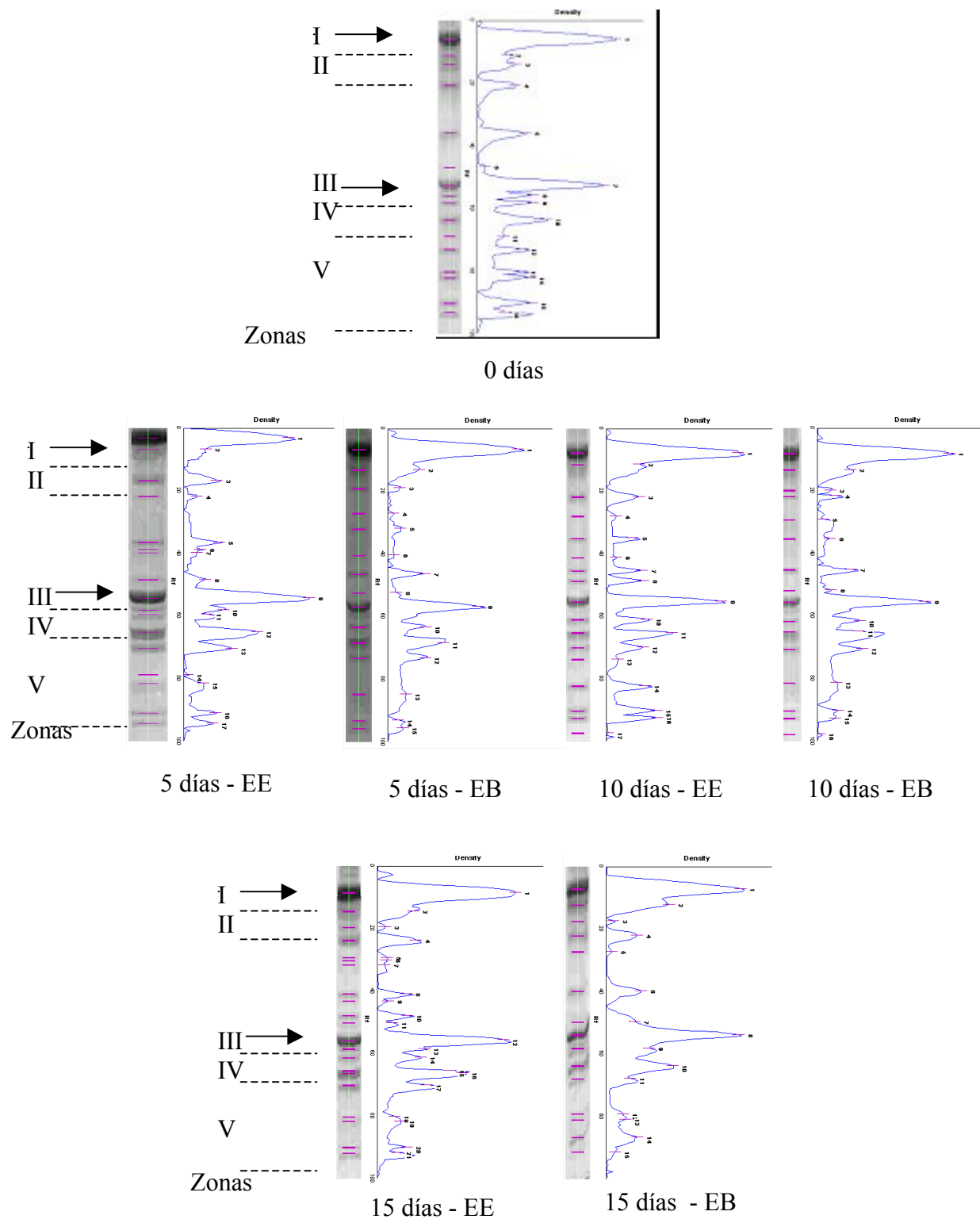


Figura 47. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo almacenadas por 15 días a 15°C. EE: efecto de enzimas endógenas, EB: efecto de enzima bacteriana

Al inicio del estudio, los picos en la zona II pudieron corresponder a actinina y proteína C, sin embargo, a lo largo del estudio se observó la formación de péptidos en las zonas II y III, posiblemente a la degradación de proteínas de alto peso molecular como la nebulina y titina, ya que se tienen reportes que las catepsinas degradan a éstas dos enzimas (Cheret, 2005).

La zona III comprende al pico que ocupa el segundo lugar en intensidad, y correspondió al peso molecular de la actina. La intensidad de éste pico permaneció constante durante el tiempo de estudio, aunque también no se descarta que la intensidad sea debida a la acumulación de cadenas polipeptídicas en ese rango de peso molecular.

Tanto los densitogramas de cazón como en el de cerdo las zonas IV y V fueron las que presentaron mayor presencia de péptidos a lo largo del estudio, siendo las muestras almacenadas a 15°C y tratadas con enzima EB en las que se observó mayor número de péptidos de bajo peso molecular (menores a 45 kDa), posiblemente debido a que éstas condiciones favorecieron una mayor proteólisis. En las muestras almacenadas a 4°C y con EE, se observó la aparición gradual de péptidos a lo largo del tiempo de estudio.

El cazón tuvo mayor número de bandas que el cerdo, reflejado en la aparición de péptidos de bajo peso molecular. Ésta observación corroboró la intensa actividad proteolítica del músculo estriado de cazón, lo que desestabiliza a las proteínas y repercute en las propiedades emulsificantes estudiadas (la capacidad de emulsión, el índice de actividad de emulsión y la estabilidad de emulsión), ya que se observó que al incrementar el tiempo de almacenamiento (tiempo de reacción de enzimas endógenas), aumentaba la desnaturalización de las proteínas, decrementando así los valores analíticos de las propiedades emulsificantes y en consecuencia desestabilización del sistema. En forma opuesta, las proteínas miofibrilares de cerdo no se desestabilizan en forma tan marcada, reflejándose en mejores propiedades emulsificantes.

6.4. Emulsiones Modelo

6.4.1. Distribución del tamaño de partícula

El objetivo de éste análisis fue establecer una homogeneidad en los tamaños de partícula durante la etapa de homogenización en la elaboración de las emulsiones de proteínas miofibrilares de cazón y de cerdo. Se tomaron muestras a los siguientes tiempos de homogenización 1 min., 3 min, 3.5 min, 4 min, y 5 min. La figura 48 muestra el decremento en el tamaño de partícula al aumentar el tiempo de homogenización.

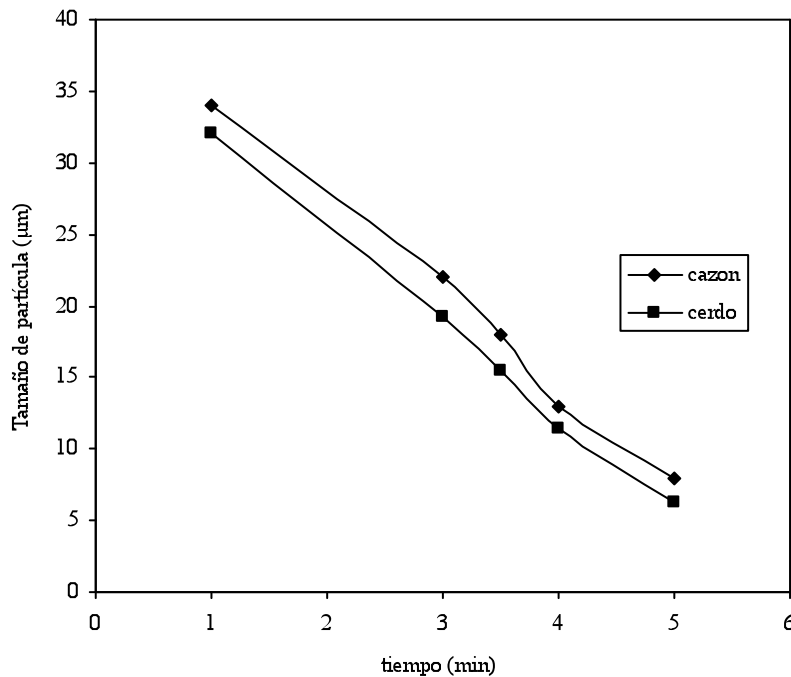


Figura 48. Tamaño de partícula de las emulsiones con respecto al tiempo de homogenización del sistema

Aparentemente, las emulsiones de cerdo tuvieron menor tamaño de partícula que las de cazón a todos los tiempos estudiados. El menor tamaño de partícula se obtuvo a los 5 min, por lo que se eligió éste tiempo para elaborar a las emulsiones. Por tanto, los intervalos de diámetro partícula fueron 8.13 a 7.12 μm para cazón, y 6.26 a 5.31 μm para cerdo.

Esta determinación se llevó a cabo con emulsiones diluidas y con agitación constante debido a que el equipo no permitía la cuantificación de partículas con emulsiones

concentradas, por lo que ésta fue una estimación del tamaño de partícula. Estos resultados se relacionaron con los encontrados por microscopía óptica, donde se observó que el tamaño de partícula fue más pequeño en emulsiones proteicas de cerdo, además de relacionarse con las propiedades emulsificantes ya que las proteínas de cerdo fueron más estables que las de cazón.

6.4.2. Viscosidad aparente

La viscosidad de las emulsiones modelo formadas se presenta en las figuras 49 y 50. Se observó que en ambas especies la viscosidad tiende a incrementarse con respecto a el tiempo, éste incremento es más notablemente en las muestras de ambas especies almacenadas a 15°C y tratadas con la enzima bacteriana (EB), debido posiblemente a la alta actividad proteolítica encontrada.

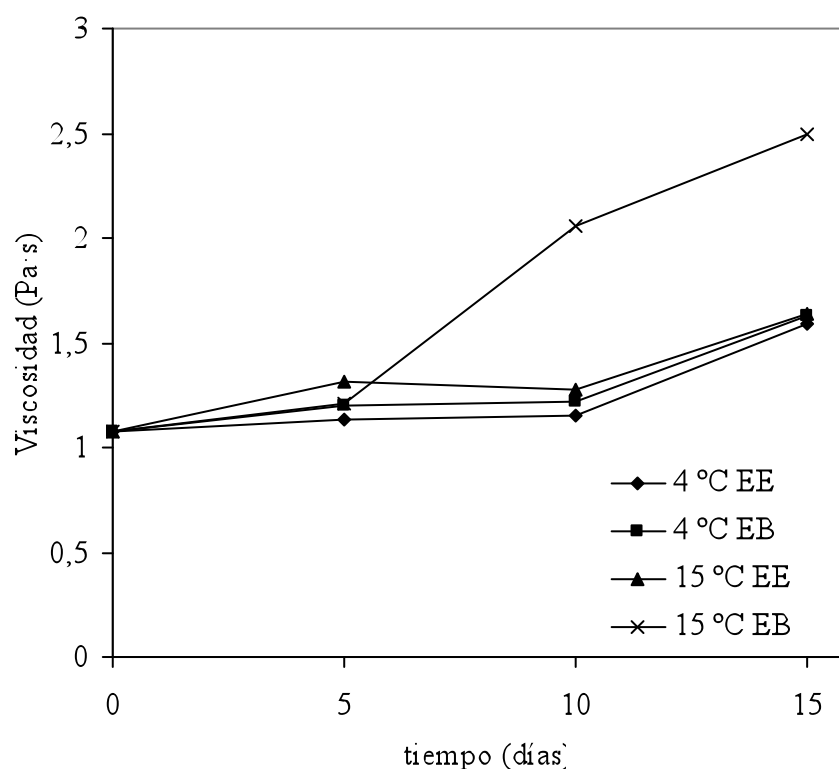


Figura 49. Viscosidad aparente de la emulsión de cazón

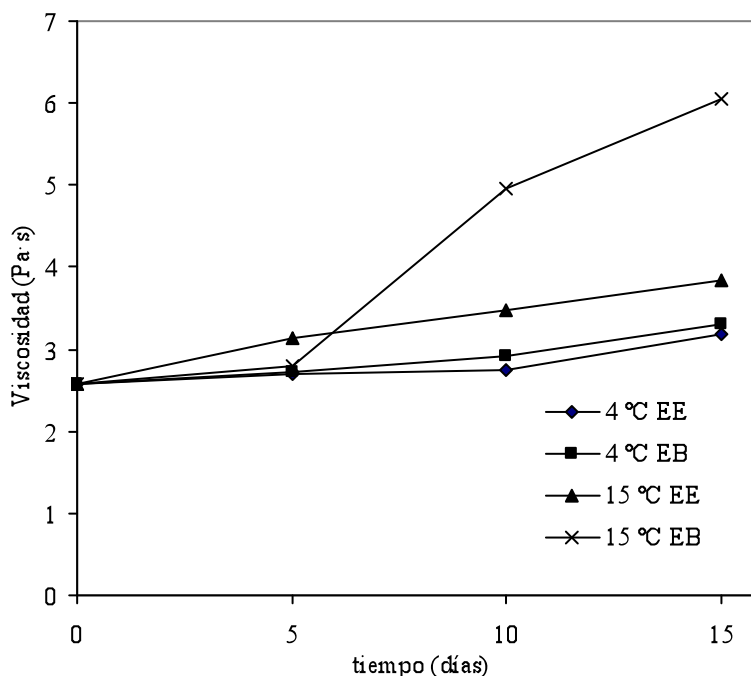


Figura 50. Viscosidad aparente de la emulsión de cerdo

Los valores medios de la viscosidad de las emulsiones formadas con proteínas de carne cazón y cerdo almacenada a 4°C, y expuestas a proteólisis por enzimas endógenas (EE) tuvieron un aumento pequeño, aunque significativo con respecto al tiempo de almacenamiento. Todas las fuentes de variación tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) sobre la viscosidad de las emulsiones proteicas de cazón (Anexo V) y de cerdo (Anexo VII), ya que tuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) con respecto al tiempo, a la temperatura y al tratamiento enzimático. En ambas especies, los tratamientos con EB tuvieron mayores valores en viscosidad que con EE.

En concordancia con los resultados obtenidos en las propiedades de emulsificación, las emulsiones proteicas de cerdo tuvieron mayor viscosidad que las de cazón (Anexo X), lo cual está relacionado con lo encontrado por algunos autores (Cofrades, 1994, Jiménez-Colmenero y Borderías, 1983), en que sugieren que las especies terrestres son más apropiadas para producir un tipo de estructura con interacciones moleculares de las proteínas que originan pocos enlaces cruzados y por lo tanto algunas propiedades

moleculares como la hidratación además de un aumento en el volumen molecular, y como consecuencia la formación de sistemas más viscosos.

6.4.3 Distribución de proteína en las fases de las emulsiones modelo

Las proteínas en las emulsiones estudiadas, aceite en agua, se dividieron para su estudio como proteínas adsorbidas y no adsorbidas. Las adsorbidas fueron las ligadas con la interfase lípido-agua, asociadas a otras de menor tamaño que ayudan a estabilizar al sistema, formando una red proteica. Éstas últimas son las proteínas no adsorbidas a la interfase. Se han llevado a cabo muy pocos estudios para observar y diferenciar el comportamiento de las proteínas miofibrilares en emulsiones, como el reportado por Mourtzinou y Kiosseoglou (2005). La figura 51 muestra el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares de cazón y cerdo, en la emulsión, y las adsorbidas y no adsorbidas a la interfase lípido-agua.

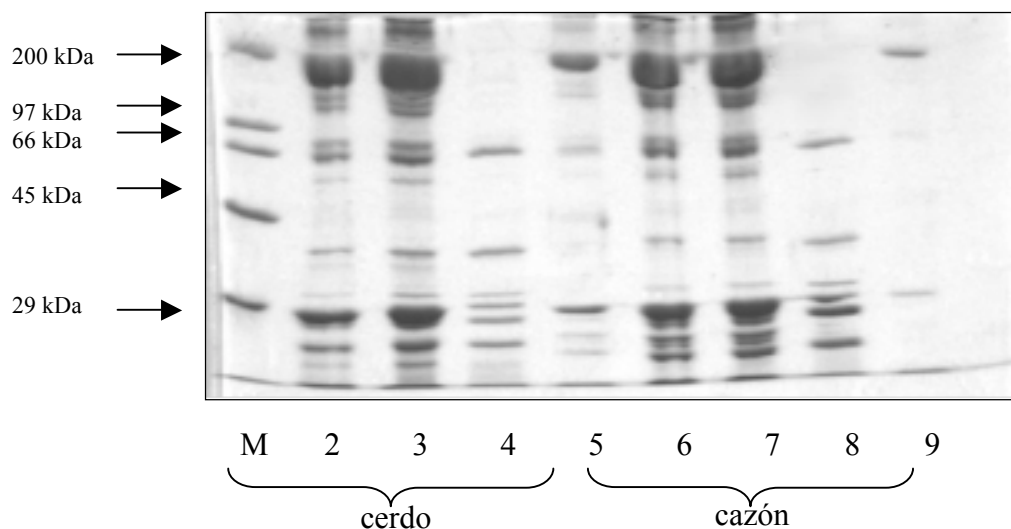


Figura 51. SDS-PAGE de proteínas miofibrilares y emulsión de cazón y cerdo
 M: marcadores; 2 y 6: proteínas miofibrilares; 3 y 7: emulsión centrifugada;
 4 y 8: proteína no adsorbida; 5 y 9: proteínas adsorbidas

Las bandas en los carriles 3 y 7, de las emulsiones centrifugadas, muestran la presencia de péptidos de bajo peso molecular, posiblemente generados durante la formación de las

emulsiones, esto podría suponer la pérdida por desnaturalización a péptidos menores a 20 kDa.

Los densitogramas del electroforetograma anterior se muestran en las figuras 52 y 53.

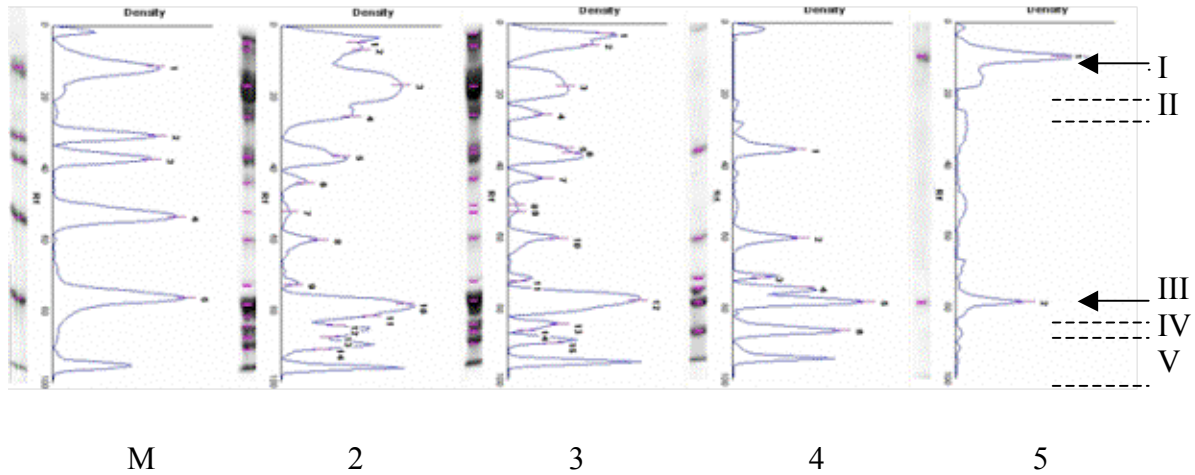


Figura 52. Densitogramas de extractos de proteínas miofibrilares y emulsiones de cazón
 M: Marcadores; 2: proteínas miofibrilares; 3: emulsión centrifugada; 4: proteínas no adsorbida; 5: proteínas adsorbidas

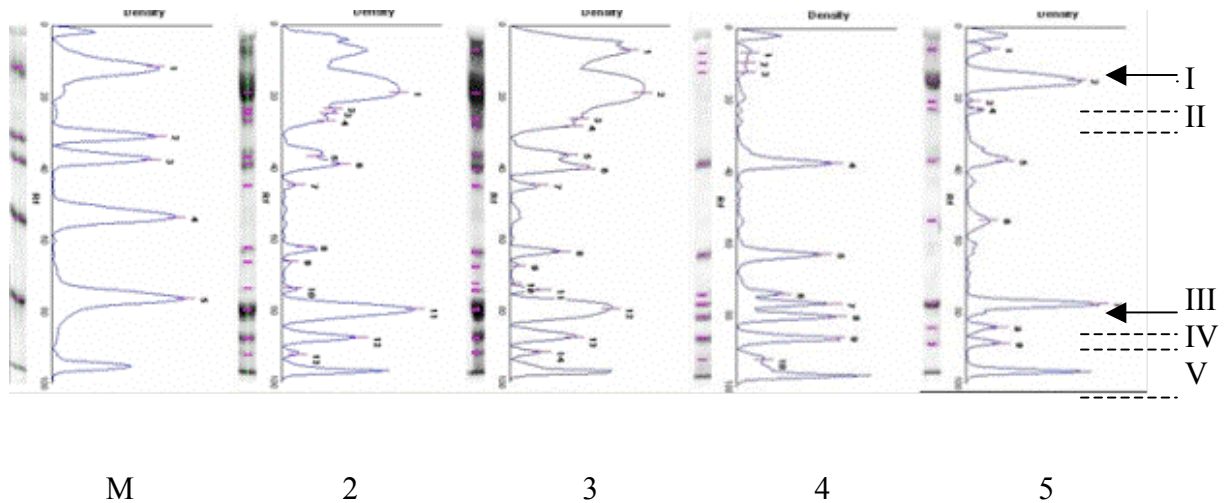


Figura 53. Densitogramas de extractos de proteínas miofibrilares y emulsiones de cerdo
 M: Marcadores; 2: proteínas miofibrilares; 3: emulsión centrifugada; 4: proteínas no adsorbidas; 5: proteínas adsorbidas

En las figuras 52 y 53 se muestran los densitogramas de las electroforesis del extracto de proteínas miofibrilares, emulsiones centrifugadas, y proteínas adsorbidas y no adsorbidas de cazón y cerdo. Los densitogramas de las proteínas miofibrilares de cazón (52-2) se presentan también en las figuras 43 y 44, y de cerdo (53-2) en las figuras 46 y 47, en almacenamiento a 4 y 15°C, respectivamente; en las figuras 51-2 y 52-2 se muestran con fines comparativos con las proteínas en la emulsión, y adsorbidas y no adsorbidas.

En las figuras 52-3 y 53-3 se presentan los densitogramas de las emulsión centrifugada; al comparar éstas muestras con las de proteínas miofibrilares se observan diferencias entre el número de bandas, lo que hace suponer una degradación de las proteínas de ambas especies por acción mecánica a la que es sometida la emulsión para su rompimiento por centrifugación.

Las figuras 52-4 y 53-4 muestran a las proteínas miofibrilares no adsorbidas en la interfase, esto es, que se encontraban en la fase acuosa. En estas imágenes se puede apreciar proteínas en la zona I. La zona II en ambas especies muestran bandas de proteínas, no hay existencia de zona III pero si se observa un zonas IV y V. Las proteínas encontradas en la zona I y III corresponde a la actina y a la miosina y no son observadas en las proteínas no adsorbidas en la emulsión.

Las figuras 52-5 y 53-5 muestran a las proteínas miofibrilares adsorbidas en la interfase, las cuales corresponden principalmente a proteínas de la zona I. En las muestras de cazón (52-5) se observó una banda de mayor intensidad, correspondiendo a un peso molecular aproximado de 200 kDa, posiblemente debido a la miosina. También se observó un pico de menor intensidad de 150 kDa. No se encontraron picos en la zona II; en la zona III se encontró otra banda con mayor intensidad, de 45 kDa, que corresponde a la actina.

En la figura 53-5 se muestran las proteínas adsorbidas en emulsiones de cerdo; se encontraron bandas en las zonas I, II, III y IV, siendo las más intensas las de las zona I y III, de 200 kDa y 45 kDa, correspondientes a miosina y actina, respectivamente.

Lo anterior supone que la miosina y la actina tanto de cazón como de cerdo son proteínas adsorbidas a la interfase, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (Cheftel, 1989; O'Neill y col., 1990; Gordon y Barbut, 1992) quienes afirman, que además de estar adsorbidas a la interfase son los principales estabilizantes de la emulsión.

Distribución de proteína en las fases de la emulsión modelo de cazón

Proteínas adsorbidas

Las figuras 54 y 55 muestran a las proteínas de cazón adsorbidas en la interfase de las emulsiones de cazón; hay diferencias notables en las proteínas de las zonas I, II y IV durante el estudio y a las diferentes condiciones de almacenamiento. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 (figura 54), así como los densitogramas (figura 55) muestran las modificaciones en las proteínas expuestas a una proteólisis endógena (EE). Los cambios observados son los siguientes:

- a) Durante los primeros 5 días de almacenamiento, se observó la aparición de dos cadenas polipeptídicas en la zona IV tanto a 4 como a 15°C.
- b) En las muestras almacenadas a 4°C, el número de bandas fue el mismo al tiempo inicial y 5 días de almacenamiento, sin embargo a 15°C se observaron diferencias, principalmente la mayor intensidad de la banda de 150 kDa, lo que hizo suponer la degradación de la cadena pesada de la miosina o de proteínas de peso molecular elevado asociadas a la interfase. Al día 10 se encontraron diferencias en el número de bandas de cadenas polipeptídicas en las muestras almacenadas 4 y a 15°C. Se observó también un aumento de bandas en la zona II, y una mayor intensidad de la banda de actina (45 kDa) y la zona IV.
- c) Al día 15 se observó la disminución en la intensidad de las bandas a 4 y 15°C, siendo más marcada en las zonas I, III y IV, apareciendo nuevas bandas en las regiones II y III.

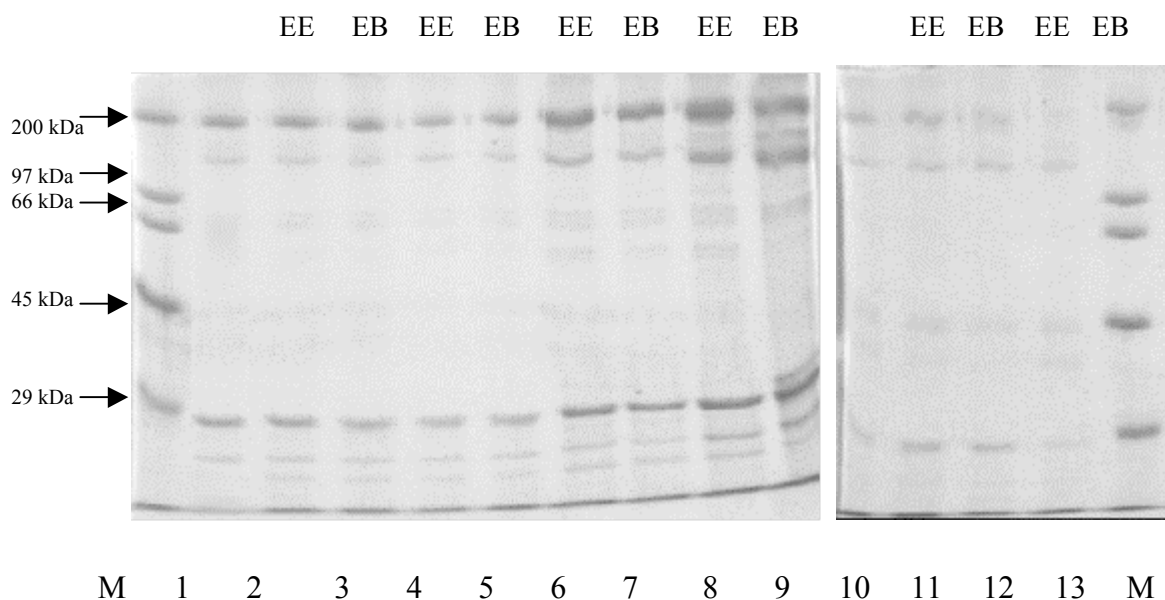


Figura 54. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cazón adsorbidas en la interfase

M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;

EB: efecto de enzima bacteriana

1: tiempo cero

2 y 3: 5 días (4°C)

4 y 5: 5 días (15°C)

6 y 7: 10 días (4°C)

8 y 9: 10 días (15°C)

10 y 11: 15 días (4°C)

12 y 13 15 días (15°C)

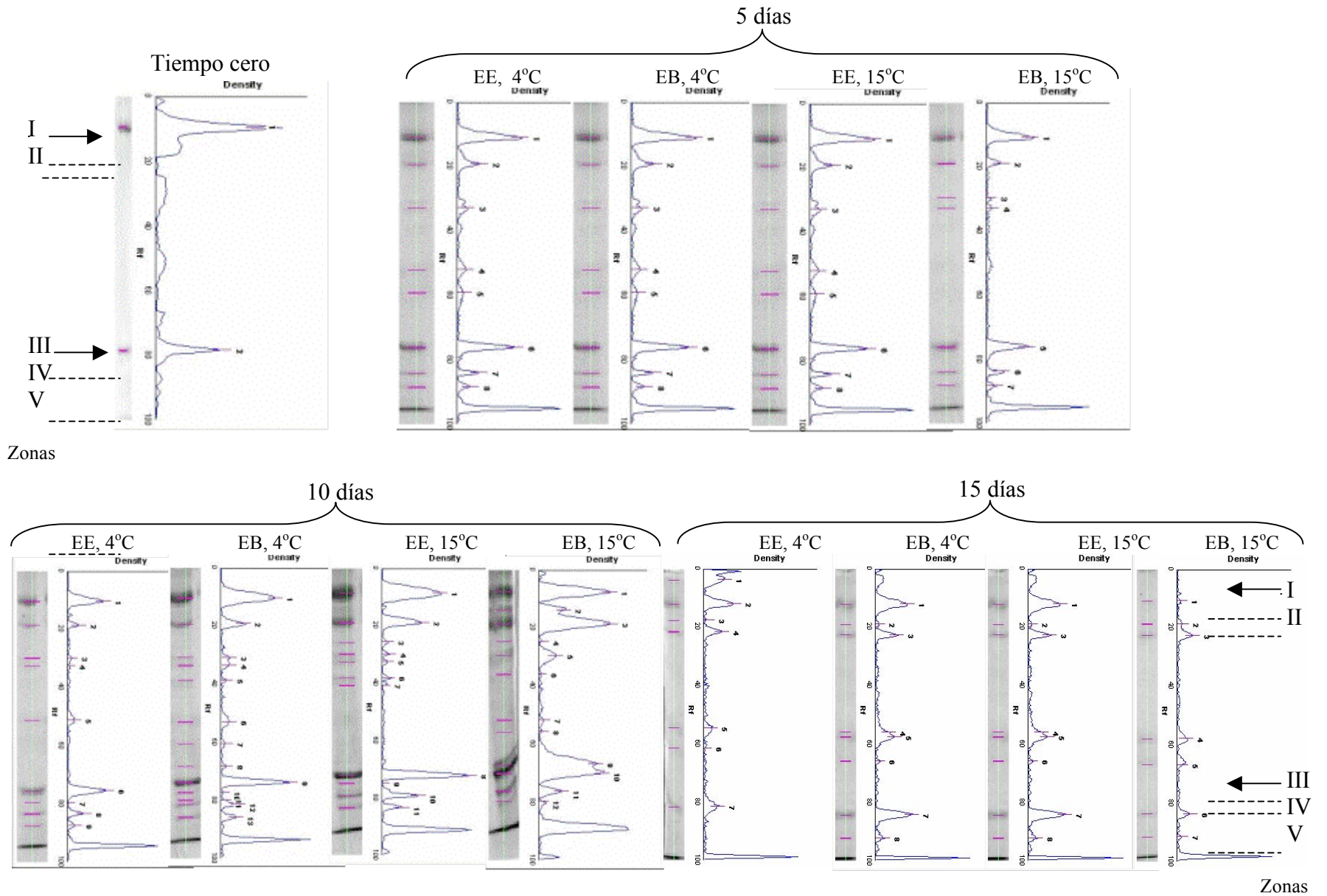


Figura 55. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazon adsorbida en la interfase

La proteólisis exógena (EB) por la enzima de *P. fluorescens*, en conjunto con las enzimas endógenas, es mostrada en los carriles 3, 5, 7, 9, 11 y 13 (figura 54). La comparación de estas muestras con el tiempo inicial (carril 1) se observó lo siguiente:

- a) Al día 5 se observaron cambios a 4 y 15°C en la zona I, debido a una disminución ligera de intensidad, apareciendo una nueva cadena polipeptídica en la zona IV.
- b) Al día 10 se encontró mayor intensidad en las bandas correspondientes a las cadenas pesadas de la miosina y a la banda de 150 kDa, de muestras almacenadas a 15°C, en comparación con las almacenadas a 4°C. Se observó una mayor intensidad en las muestras tratadas con EE a 15°C; en la zona III apareció una banda entre 45 kDa y aproximadamente 54 kDa, la cual puede ser atribuida a la degradación de miosina o proteínas de mayor peso molecular.
- c) Al día 15 se observó la pérdida de intensidad de las bandas en ambas muestras almacenadas a 4 y 15°C, más marcada a 15°C debido a la degradación de miosina, aunque permaneció la banda de 150 kDa. Se detectaron pérdidas de proteínas en todas las zonas.

En resumen se observa que el tratamiento de enzima bacteriana (EB) tuvo efecto en la aparición y desaparición de bandas de polipéptidos, esto es que bajo tratamiento con enzima bacteriana se observó al principio del estudio aparición de bandas y al final de éste desaparición de bandas. Así mismo la temperatura tuvo un papel importante en éste estudio ya que a valores de 15°C, ya que mientras la temperatura se aproxime al valor óptimo de actividad enzimática, ésta se incrementará.

Los resultados encontrados en éste estudio de proteínas de cazón están relacionados con las propiedades emulsificantes, ya que la estabilidad de la emulsión de cazón disminuyó a lo largo del tiempo de estudio, siendo afectada por la temperatura y el tipo de enzima (EE o EB). La cadena polipeptídica de 150 kDa se observó a lo largo de todo el estudio así como en la interfase; sin embargo, los resultados obtenidos en las propiedades emulsificantes

hacen suponer que ésta cadena polipeptídica no ayudó a la estabilidad del sistema de la emulsión.

Proteínas no adsorbidas

Las figuras 56 y 57 muestran a las proteínas no adsorbidas en la interfase en las emulsiones de cazón; en las cuales se observan las bandas en las zonas I, II, III y IV durante el estudio.

Los carriles 3, 5, 7, 9, 12 y 14 (figura 56) y los densitogramas correspondientes (figura 57), muestran el efecto de las proteínas miofibrilares al ser expuestas a proteólisis endógena (EE). Comparando éstos electroforetogramas con el carril 2 (tiempo cero), se observan tres bandas intensas de 91 kDa, 57 kDa y 47 kDa, y dos bandas de bajo peso molecular en la zona IV. Estas bandas corresponden a las siguientes observaciones:

- a) Al día 5 las muestras almacenadas a 4 y 15 °C no mostraron bandas en la zona I, sin embargo se observó la aparición de una banda de mayor intensidad a 37 kDa en la zona IV, en muestras almacenadas a 15°C.
- b) Al día 10 las muestras mostraron la presencia de una cadena polipeptídicas en la zona I, con mayor intensidad a 15 que a 4°C, además de un aumento en intensidad en bandas de pesos moleculares arriba de 205 kDa y en la zona IV.
- c) Al día 15 se intensificaron las bandas arriba de 205 kDa, en la zona I y en la zona IV, observándose mayor efecto en las muestras almacenadas a 15°C en las bandas de 40, 38, 37, 35 y 30 kDa.

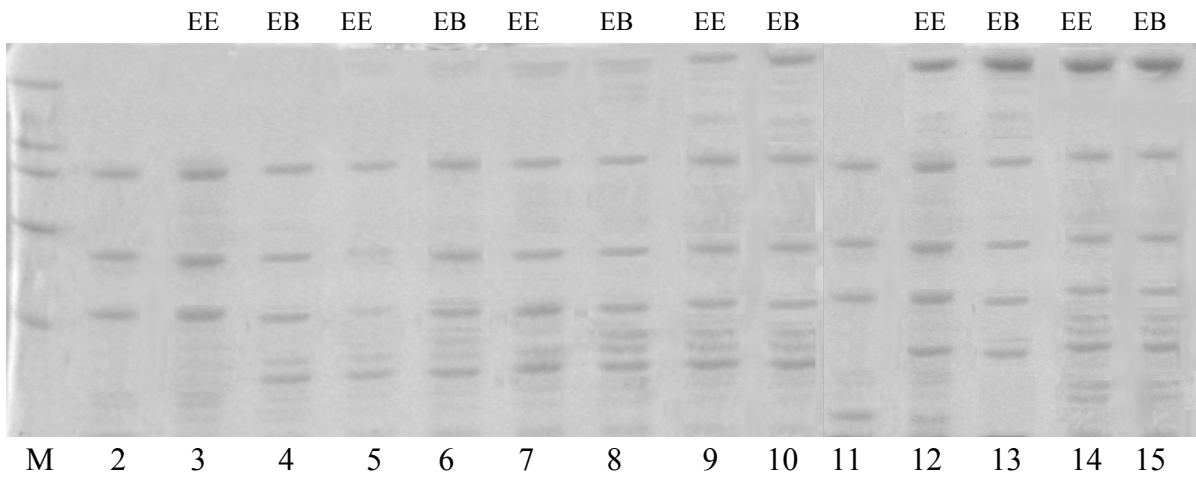


Figura 56. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cazón no adsorbidas en la interfase
M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;
EB: efecto de enzima bacteriana
2 y 11: tiempo cero
3 y 4: 5 días (4°C) 5 y 6: 5 días (15°C)
7 y 8: 10 días (4°C) 9 y 10: 10 días (15°C)
12 y 13: 15 días (4°C) 14 y 15: 15 días (15°C)
a: 205 kDa; b: 97 kDa; c:64 kDa; d: 45 kDa; e: 29 kDa

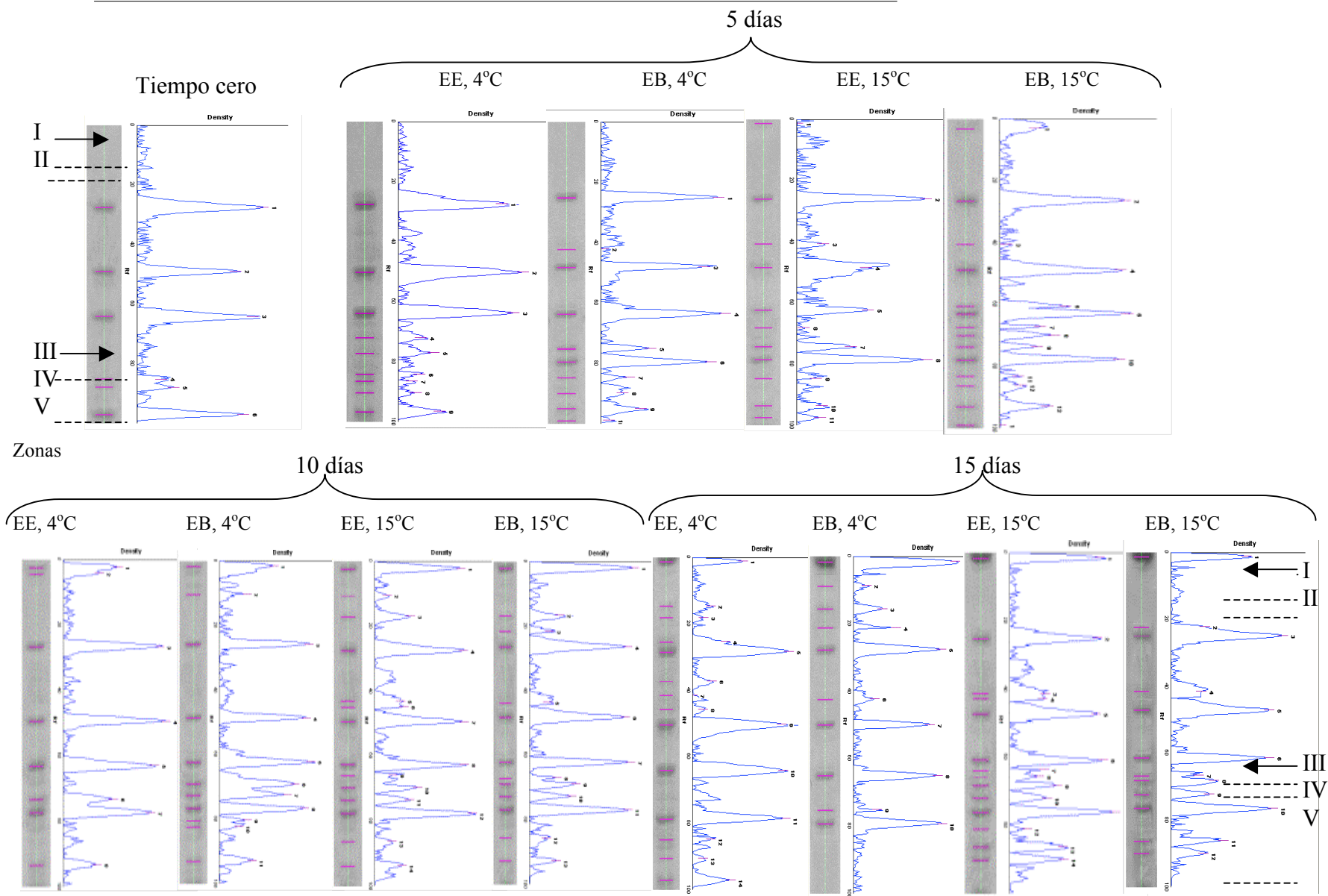


Figura 57. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cazón no adsorbida en la interfase

Zonas

Con respecto al tratamiento con la enzima bacteriana (EB) en conjunto con las enzimas endógenas (EE), se encontró lo siguiente:

- a) A los 5 días se observaron diferencias en la intensidad y número de bandas entre muestras almacenadas a 4 y a 15°C. A 4°C no hubo presencia de bandas arriba de 205 kDa, mientras que en las muestras almacenadas a 15°C se distinguió la aparición de una cadena, así como seis cadenas menores a 45 kDa en la zona IV, mientras que a 4°C solo se encontraron tres cadenas.
- b) Al día 10 se observó el aumento de intensidad de la banda superior a 205 kDa en ambas temperaturas, mientras que a 15°C se observó la aparición de bandas en la zona I y permanencia de bandas en la zona IV.
- c) Al día 15 se observó la permanencia de bandas en la zona I a 4°C, mientras que a 15°C éstas bandas se degradaron, dando como consecuencia mayor número de bandas menor a 45 kDa en la zona IV.

En conclusión, éste análisis mostró la aparición de bandas de peso molecular arriba de 205 kDa y en la zona I. Se puede suponer que las enzimas -endógenas y exógenas- actuaron sobre las proteínas de alto peso molecular a lo largo del tiempo de estudio, mientras que la aparición de bandas en las zonas I y II podría ser atribuido a la degradación continua de las proteínas de alto peso molecular y de las proteínas estabilizantes de la emulsión – actina y miosina – de ahí la pérdida de la capacidad emulsificante de las mismas. Se observó además que las muestras almacenadas a 15°C, tratadas con EB se degradaron más que las almacenadas a 4°C y tratadas con EE, siendo evidente éste hecho por la aparición de cadenas polipeptídicas. Es importante señalar que muchas bandas que aparecen en los densitogramas son resultado “ruido pixelar” durante el análisis de la imagen.

Distribución de proteína en las fases de la emulsión modelo de cerdo

Se discute a continuación el comportamiento de las proteínas miofibrilares adsorbidas y no adsorbidas en la interfase de emulsiones de cerdo y el efecto de la proteólisis de enzimas endógenas y de la enzima microbiana durante el tiempo de estudio.

Proteínas adsorbidas

Los electroforetogramas y densitogramas de la proteína adsorbida en la interfase en las emulsiones de cerdo se muestran en las figuras 58 y 59.

Al comparar los carriles 3, 5, 7, 9, 12 y 14 (figura 58) y los densitogramas (figura 59), se observa la modificación de las proteínas miofibrilares al ser expuestas a proteólisis endógena (EB); se encontró lo siguiente:

- a) Al día 5, las muestras a 4° y 15°C no mostraron diferencias en la zona I correspondiente a la miosina ni en la zona III correspondiente a la actina, sin embargo se observó degradación en las muestras almacenadas a 15°C en las zonas II y III.
- b) Al día 10, no se observó disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a actina y miosina, sin embargo se observó acumulación de bandas entre las zonas II y III.
- c) Al día 15, se observó la disminución de la intensidad de las bandas en las zonas II y IV, mientras que las bandas de miosina y actina permanecieron inalteradas.

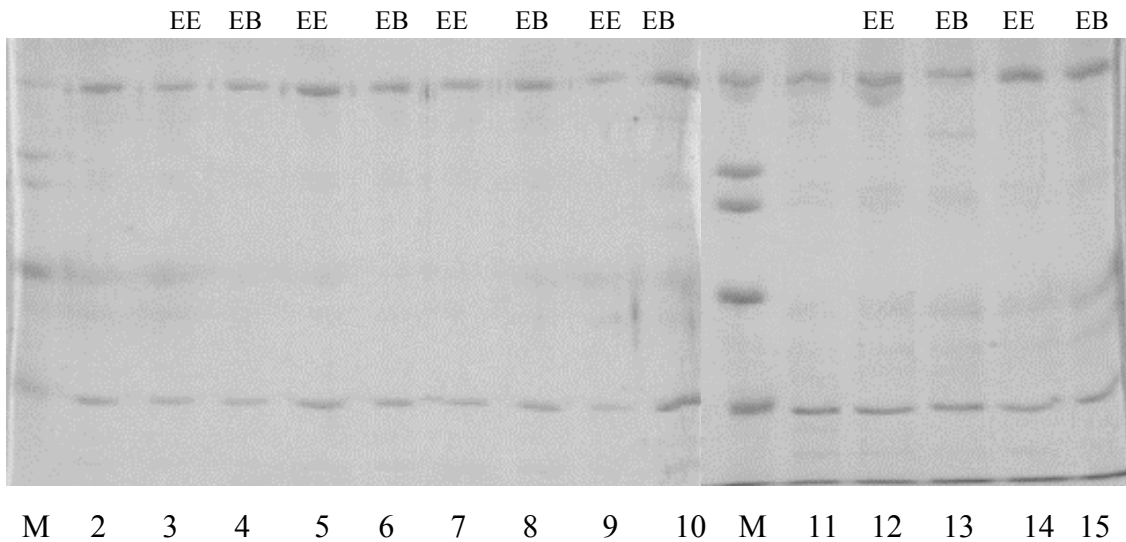


Figura 58. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cerdo adsorbidas en la interfase

M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;

EB: efecto de enzima bacteriana

2 y 11: tiempo cero

3 y 4: 5 días (4°C) 5 y 6: 5 días (15°C)

7 y 8: 10 días (4°C) 9 y 10: 10 días (15°C)

12 y 13: 15 días (4°C) 14 y 15: 15 días (15°C)

a: 205 kDa; b: 97 kDa; c: 64 kDa; d: 45 kDa; e: 29 kDa

Con respecto al efecto de la enzima bacteriana (EB), en conjunto con las enzimas endógenas se encontró lo siguiente:

- Al día 5 se observaron dos bandas de mayor intensidad (miosina y actina), con respecto a las otras. Sin embargo, también fueron evidentes bandas en la zona IV en muestras almacenada a 15°C que a 4°C.
- Al día 10, las dos bandas correspondientes a cadenas pesadas de miosina y actina permanecieron, aunque en las muestras a 15°C se observó una degradación con la subsiguiente aparición de bandas en las zonas II y III, además del aumento en bandas menores a 45 kDa.
- Al día 15 se observó el efecto de las enzimas (EE y EB) ya que las dos bandas evidentes disminuyeron en intensidad, además que desaparecieron las bandas en las zonas II, III y IV.

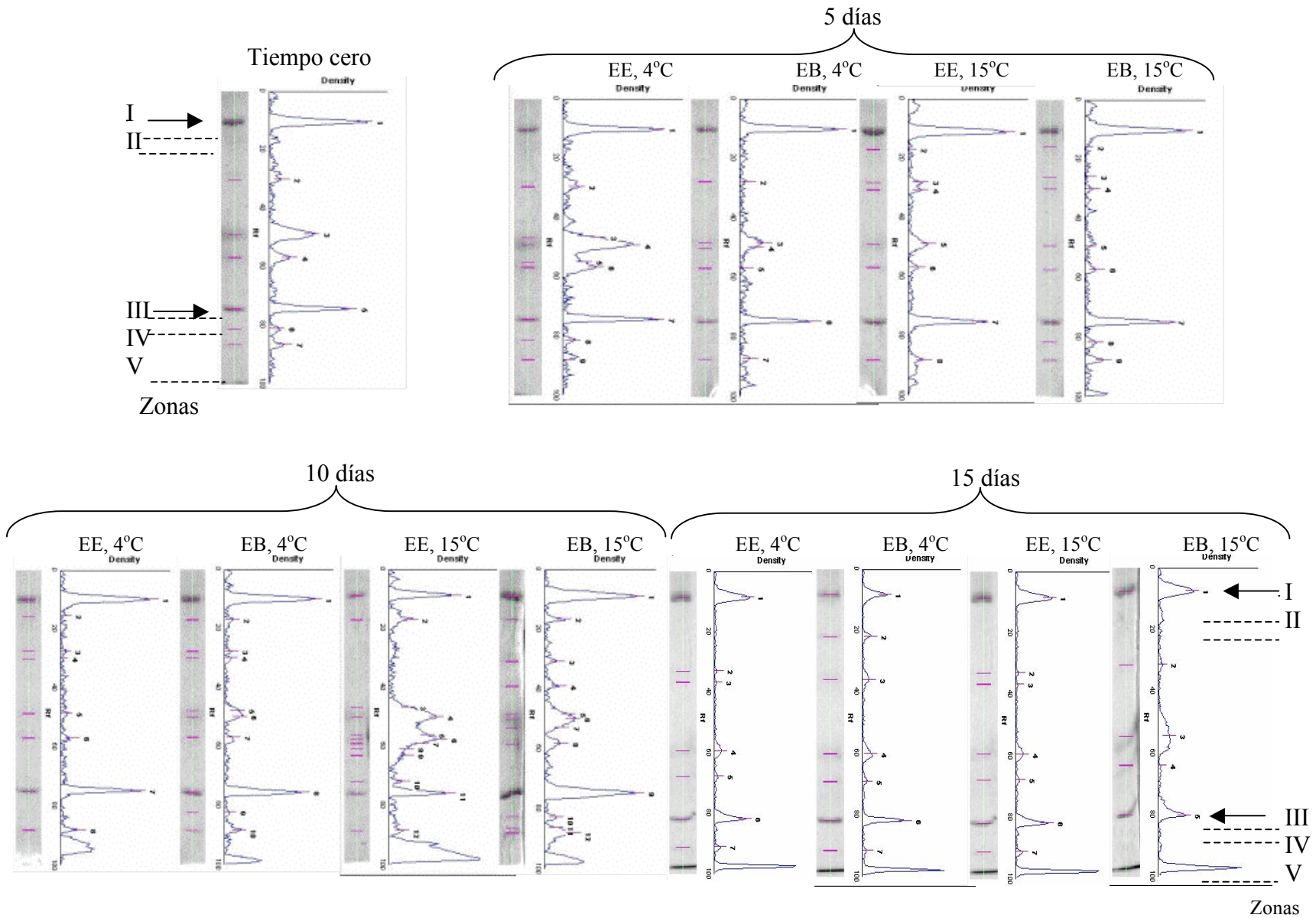


Figura 59. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo adsorbida en la interfase

En resumen, los cambios observados fueron los siguientes:

- a) A lo largo de todo el análisis se observaron dos bandas de mayor intensidad, a 205 kDa y 45 kDa, correspondiente a miosina y actina.
- b) Al transcurrir el tiempo de estudio, se incrementó el número de bandas, observándose mayor efecto a 15°C, y en muestras tratadas con EB.

A diferencia del cazón, el cerdo no mostró una banda a 150 kDa, relacionada con una cadena que interviene en la formación de la interfase, observada también en las electroforesis, junto con las bandas de miosina y actina, las cuales forman la película interfacial de las emulsiones.

El cerdo es la especie más empleada en la elaboración de productos cárnicos, debido a las propiedades funcionales de sus proteínas miofibrilares. Éste hecho fue observado en la presente tesis al comparar las propiedades emulsificantes del cerdo con el cazón.

En los extractos proteicos de cazón, cuando hubo una sobre exposición no controlada de las enzimas, se observó una degradación casi completa de la miosina, mientras que en los extractos proteicos de cerdo, la miosina permanece estable al ser sometida a condiciones similares a las de los extractos proteicos de cazón.

Proteínas no adsorbidas

Los electroforetogramas y densitogramas de la proteína no adsorbida en la interfase en las emulsiones de cerdo se muestran en las figuras 60 y 61.

Se observó que las modificaciones de las proteínas miofibrilares expuestas a EE fueron las siguientes:

- a) Al día 5 aparecieron bandas entre 66 kDa y 92 kDa en muestras almacenadas a 15°C; se observó una banda arriba de 45 kDa y tres bandas en la zona de IV en muestras almacenadas a 4 y 15°C.
- b) Al día 10 se observó la aparición de dos cadenas próximas entre sí, alrededor de 92 kDa, la cadena arriba de 45 kDa ya observada a los 5 días, y bandas en la zona IV.
- c) Al día 15 se observó nuevamente a las bandas próximas a 92 kDa y en las zonas II y III.

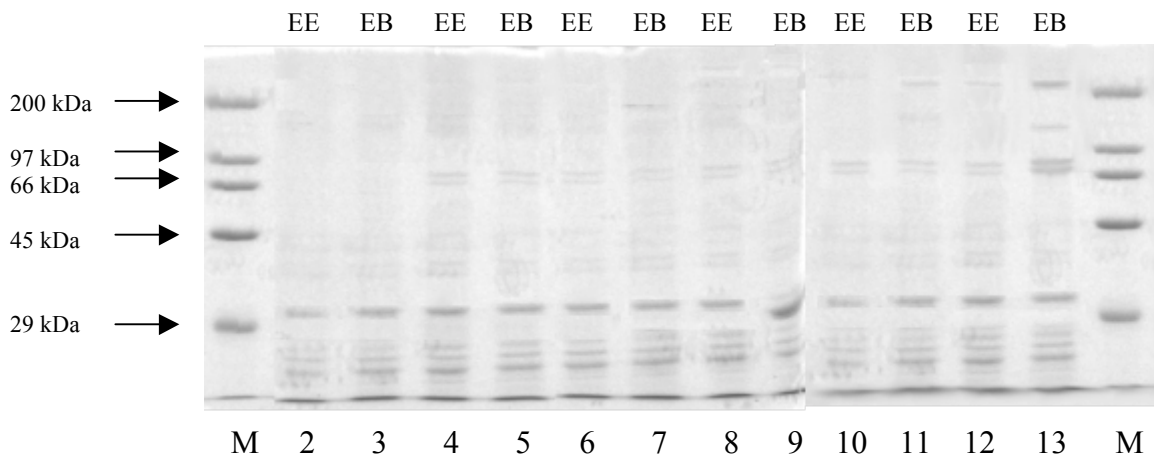


Figura 60. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares de cerdo no adsorbidas en la interfase
M: Marcador de peso molecular; EE: efecto de enzimas endógenas;
EB: efecto de enzima bacteriana
2 y 3: 5 días (4°C) 4 y 5: 5 días (15°C)
6 y 7: 10 días (4°C) 8 y 9: 10 días (15°C)
10 y 11: 15 días (4°C) 12 y 13: 15 días (15°C)

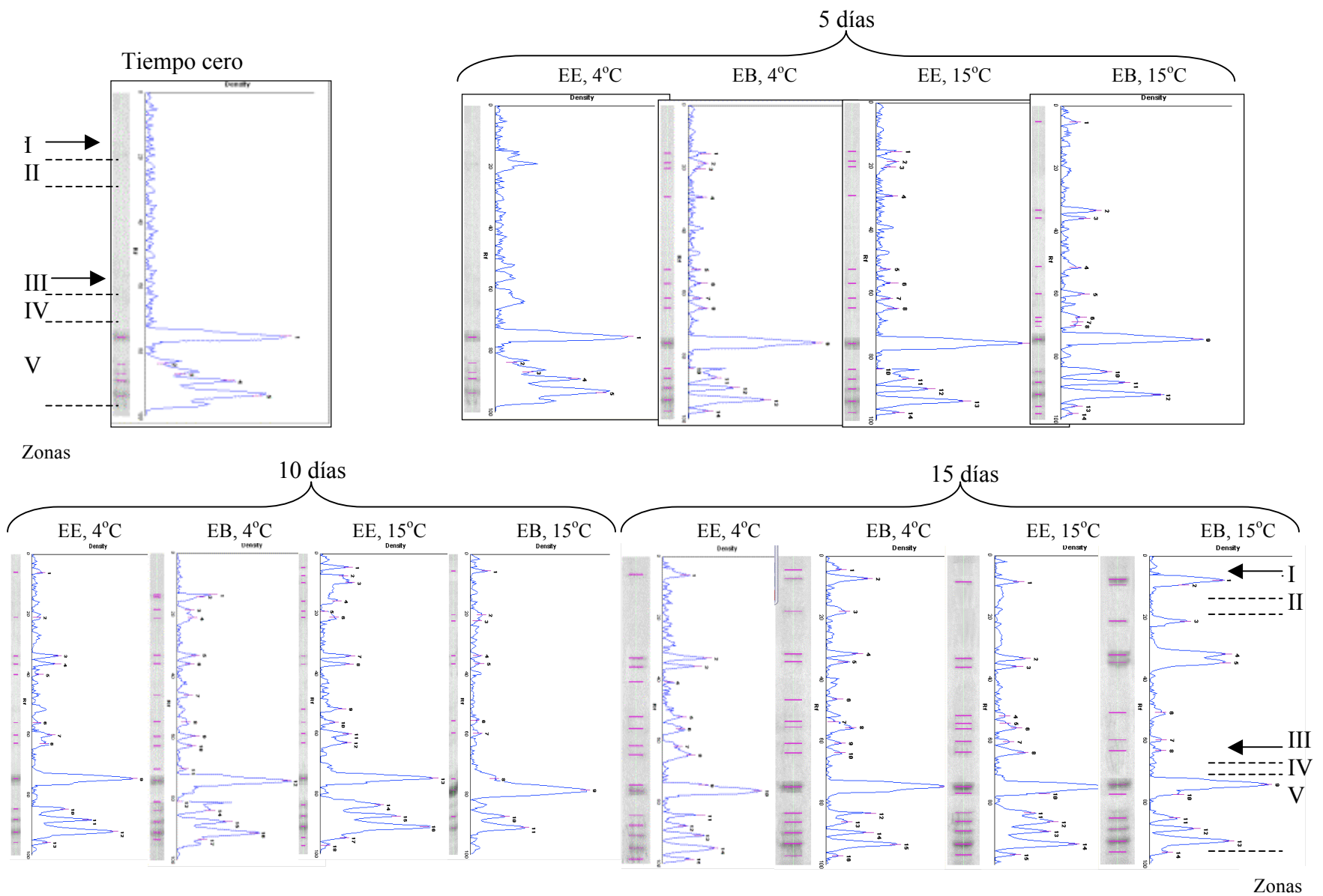


Figura 61. Densitogramas de proteínas miofibrilares de cerdo adsorbida en la interfase

Con respecto al efecto de la enzima bacteriana (EB), por el extracto enzimático de *P. fluorescens* en conjunto con las enzimas expuestas a proteólisis endógena (EE), se encontró lo siguiente:

- a) Al día 5 el efecto más notable fue el la temperatura de almacenamiento; a 15°C se observó la aparición de dos bandas próximas entre si, de alrededor de 92 kDa, éste efecto no se observó en muestras a 4°C. También se observó la presencia de una banda arriba de 45 kDa y bandas en la zona IV.
- b) Al día 10 se observó la permanencia de la banda arriba de 205 kDa y de las bandas de la zona IV.
- c) Al día 15 se observaron bandas próximas a 92 kDa y en las zonas II y IV, así como la aparición de bandas en la zona de 205 kDa.

La distribución de las proteínas miofibrilares en las distintas fases de la emulsión, a lo largo del estudio, tuvo las siguientes características:

- a) Una banda muy intensa de peso molecular arriba de 45 kDa, la cual se presentó a lo largo del estudio, junto con bandas de 35, 37 y 38 kDa.
- b) Los cambios más representativos fueron observados en las zonas I, entre II y III.
- c) En ningún momento del estudio se presentó una banda de 45 kDa en la zona III
- d) Los mayores efectos se observaron en las muestras almacenadas a 15°C tratadas con EB, en comparación con las muestras a 4°C y las tratadas con EE.

Los resultados obtenidos en los estudios de distribución de las proteínas en las fases de las emulsiones modelo sugirieron que probablemente la degradación de las proteínas miofibrilares fue dependiente del tiempo y la temperatura de almacenamiento, observándose éste hecho en ambas especies, y siendo más marcado en las muestras de proteínas no adsorbidas en la interfase de ambas especies.

Es preciso señalar que la aparición de bandas de peso molecular en la zona I y por arriba de ésta zona sugiere la degradación de proteínas de muy alto peso molecular, como la

conectina (o titina) en sus dos fragmentos, α y β conectina (titina 1 y 2), cuyos pesos moleculares oscilan entre 2400 y 2100 kDa, y la nebulina con un peso molecular de 800 kDa. Éste hecho está relacionado con las bandas encontradas por Mitsuhashi y col. (2002) quienes hicieron estudios de cinética térmica de degradación de proteínas miofibrilares de pescados, y encontraron la presencia de nuevas bandas, debido a la degradación de las proteínas de muy alto peso molecular. Estos autores también observaron que, durante los primeros días de almacenamiento, se apreciaba la titina 1 como una banda más intensa y de área relativa mayor que la de la titina 2; sin embargo, conforme pasaba el tiempo de estudio observaron la desaparición de titina 1 y un aumento en la intensidad de la banda de 2100 kDa, correspondiente a la titina 2. Posteriormente se encontró una banda de 1200 kDa y otra de más de 400 kDa, la cual supusieron era un producto de la degradación de titina 1.

Se supone que la aparición de cadenas polipeptídicas deriva también de la hidrólisis enzimática de la titina y nebulina, principalmente en los análisis de las muestras de proteínas no adsorbidas en la interfase ya que la literatura (Jones y Mandingo, 1982; O'Neill y col., 1989 y 1990; Gordon y Barbut, 1997; Mourtzinos y Kiosseoglou, 2005) sugiere que la miosina es el principal componente en la película interfacial. Sin embargo, el presente estudio demostró que también la actina es un componente activo en la estabilización de la interfase de la emulsión de ambas especies.

6.4.4. Balance de materia con respecto a la proteína en cada fase de la emulsión modelo.

Se realizó un balance en cuanto al contenido de proteína en cada una de las fases con respecto al contenido total en cada una de las emulsiones modelo (expresadas en %).

Se tomó en cuenta que:

$$P_{em} = P_{ads} + P_{no\ ads} \quad (2)$$

Donde:

P_{Total} = Concentración de proteína en la emulsión modelo (expresada en 100%)

$P_{no\ ads}$ = Concentración de proteína en la fase acuosa después de la centrifugación (%)

P_{ads} = Concentración de proteína en la interfase, calculada por diferencia de P_{em} y $P_{no\ ads}$

La ecuación supone que la concentración total de la proteína (P_{Total}) utilizada en la formación de la emulsión modelo, es idealmente encontrada en dos formas en el sistema: la proteína adsorbida (P_{ads}) y proteína no adsorbida ($P_{no\ ads}$), y en la práctica la sumatoria de éstas dos es aproximadamente igual a la concentración de proteína total

Las figuras 62 y 63, muestra el comportamiento de las proteínas miofibrilares de las especies en cada una de las fases. Se puede apreciar que estos son complementarios, ya que la suma de los porcentajes entre la proteína adsorbida y no adsorbida correspondientes al mismo día, tratamiento y temperatura dan como resultado el 100%, el cual corresponde a la concentración de proteína total con la que se realizó la emulsión.

En la figura 62 se puede observar el comportamiento de las proteínas adsorbidas y no adsorbidas en emulsiones de cazón.

Todas las fuentes de variación con excepción de la temperatura tuvieron un efecto significativo ($P < 0.001$) en el porcentaje de proteína adsorbida y no adsorbida en la interfase (Anexo V). Al parecer la absorción de proteínas en la interfase se ve favorecida por el tratamiento con enzima bacteriana (67.2830%) que con efecto de enzimas endógenas (63.9717) Anexo VI, mientras que el mayor porcentaje de las proteínas no adsorbidas fue favorecida por el efecto de las enzimas endógenas (36.0283 %) que por la acción de la enzima bacteriana (32.7175 %) Anexo VI. Al relacionar estos valores con los encontrados en la actividad enzimática (Sección 6.2.1), donde el mayor efecto lo tuvo la EB, por lo que se podría concluir que a mayor actividad proteolítica mayor capacidad de adsorción de proteínas en la superficie del glóbulo, lo cual concuerda con lo reportado por Damodaran (1996b) donde sugiere que la velocidad de cadenas polipépticas de menor peso molecular hacia la superficie del glóbulo es mayor que las cadenas de gran peso molecular.

Por otro lado, el porcentaje de proteína adsorbida en la interfase con respecto al tiempo tuvo diferencias significativas ($P < 0.001$) Anexo V. Se observó un incremento en el porcentaje de proteína adsorbida hasta el día 10 (61.820%, 64.366%, 68.511% a 0, 5 y 10 días respectivamente), posteriormente disminuyó (67.811%) al día 15 (Anexo VI). Éste

hecho se refleja en los electroforetogramas y en los densitogramas correspondientes a la proteína de cazón adsorbida, donde se aprecia que al término del estudio la zona I, correspondiente a la miosina se va perdiendo, siendo ésta proteína muy importante en la estabilización del sistema. Lo anterior podría sugerir que a tiempo de 10 días la actividad enzimática podría ser ayuda en mejorar las propiedades adsorbentes de las proteínas, en la superficie del glóbulo.

En el caso del porcentaje de las proteínas no adsorbidas ocurrió lo contrario a lo encontrado en los porcentajes de las proteínas adsorbidas, observándose una disminución del porcentaje y después un ligero aumento (38.180%, 35.633%, 31.488%, 32.188% al día 0, 5, 10 y 15, respectivamente) (Anexo VI).

La figura 61 muestra el comportamiento de las proteínas adsorbidas y no adsorbidas en emulsiones de cerdo. La figura 61A, muestra las proteínas adsorbidas en la interfase y en la figura 61B se aprecian las proteínas no adsorbidas en la interfase.

Al igual que las muestras de cazón, todas las fuentes de variación mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) a excepción del efecto de la temperatura (Anexo VII).

El porcentaje de las proteínas adsorbidas en la interfase con respecto al tiempo tuvo efecto significativo ($P < 0.001$) (Anexo VIII).

Con respecto al tiempo cero, en el día 5 mostró un aumento en el porcentaje de proteína adsorbida (87.211 %), posteriormente una disminución al día 10(30.625%) y al día 15 un ligero aumento (41.874%) (Anexo VIII).

En el caso del porcentaje de las proteínas no adsorbidas ocurrió lo contrario a lo encontrado en los porcentajes de las proteínas adsorbidas, ya que se encontró una disminución al día 5 (12.78%) con respecto al tiempo cero (25.396%), al día 10 un incremento (69.374%) y al día 15 un ligero descenso (58.125%) (Anexo VIII). Éste análisis se puede relacionar con los electroforetogramas y los densitogramas encontrados en la sección 6.4.3 en las proteínas

adsorbidas de cerdo, donde se aprecia diferencias en el número de bandas correspondientes a proteínas que son adsorbidas en la interfase del glóbulo.

Contrariamente a lo ocurrido con el cazón, la absorción de proteínas en la interfase se ve favorecida por el tratamiento con enzima endógenas (59.315%) que con efecto de la enzima bacteriana (57.841%) (Anexo VIII), mientras que la no absorción de proteínas se vio favorecida por el efecto de la enzima bacteriana (42.158 %) que por la acción de la enzimas endógenas (40.684 %) (Anexo VIII).

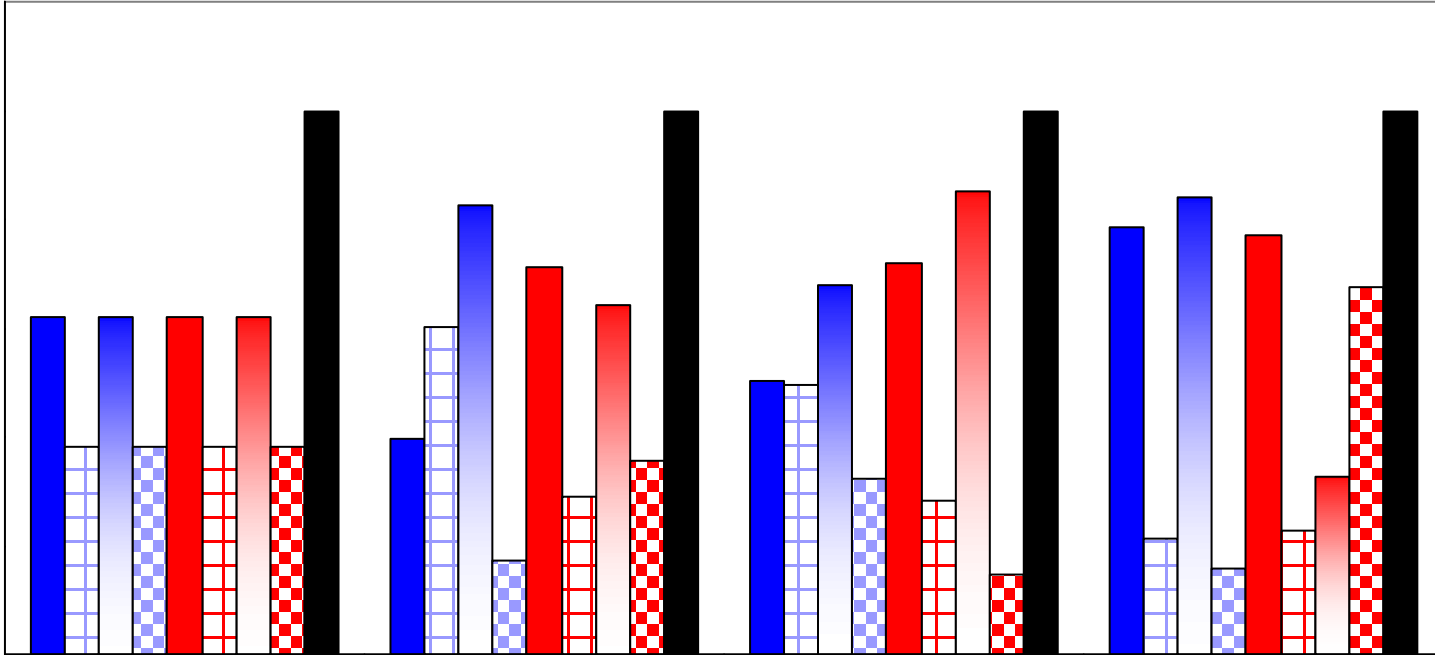


Figura 60. Porcentaje de proteína en cada fase de las emulsiones de cazón

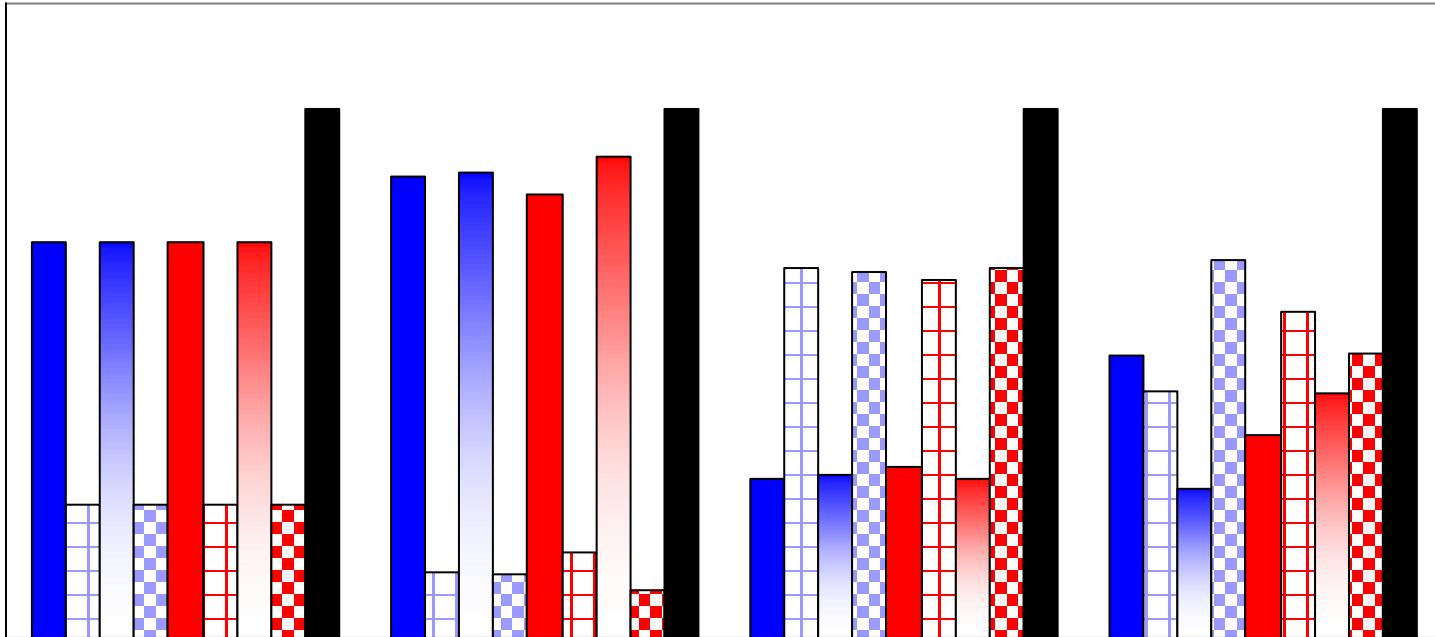


Figura 61. Porcentaje de proteína en cada fase de las emulsiones de cerdo
A: proteína adsorbida; B: proteína no adsorbida.

En la comparación entre especies, las variables de tiempo y tratamiento presentaron un efecto significativo en la concentración de proteínas adsorbidas y no adsorbidas con excepción de la temperatura ($P < 0.001$) (Anexo IX). Lo anterior es debido a lo observado en los electroforetogramas de la sección 6.3.3 donde la degradación de las proteínas afecta, su intervención en las fases, ya que se observan diferencias en los electroforetogramas y densitogramas de cada una de las dos fases.

Al parecer las proteínas miofibrilares de cerdo se ven favorecidas en la adsorción en la interfase, teniendo un mayor porcentaje de proteína adsorbida (41.421%) que las proteínas del cazón (34.372%) (Anexo X). Lo cual fue reflejado en la mayor cantidad de aceite durante la emulsificación que permitieron las proteínas de cerdo (Sección 6.3.1) en comparación con las de cazón.

Por otro lado se encontró un alto porcentaje de proteínas miofibrilares de cazón no adsorbidas en la interfase (65.627%) respecto al cerdo (58.578%) (Anexo X), probablemente debido a la mayor actividad proteolítica que presentan los animales marinos (Cheret y col., 2007), y a los valores altos de actividad enzimática encontrados en la carne de cazón, en comparación con los de cerdo (sección 6.2.1).

6.4.5. Microscopía óptica de las emulsiones

La microscopía óptica fue una herramienta para observar el tamaño, la forma y la dispersión de las emulsiones formadas. La figura 64 muestra las microfotografías de las emulsiones estudiadas.

En las figuras A, C y E se observan las emulsiones con proteína miofibrilar de cazón a diferentes tiempos; el tamaño de partícula dependió del tiempo de homogenización; a 5 min se obtuvieron las partículas más pequeñas, al igual que en emulsiones proteicas de cerdo (figuras B, D y F). Lo anterior está relacionado con el tamaño de partícula, reportado en la Sección 6.4.1., en el que se observó que el tamaño de partícula fue más pequeño en emulsiones de cerdo que en cazón en todos los tiempos de estudio.

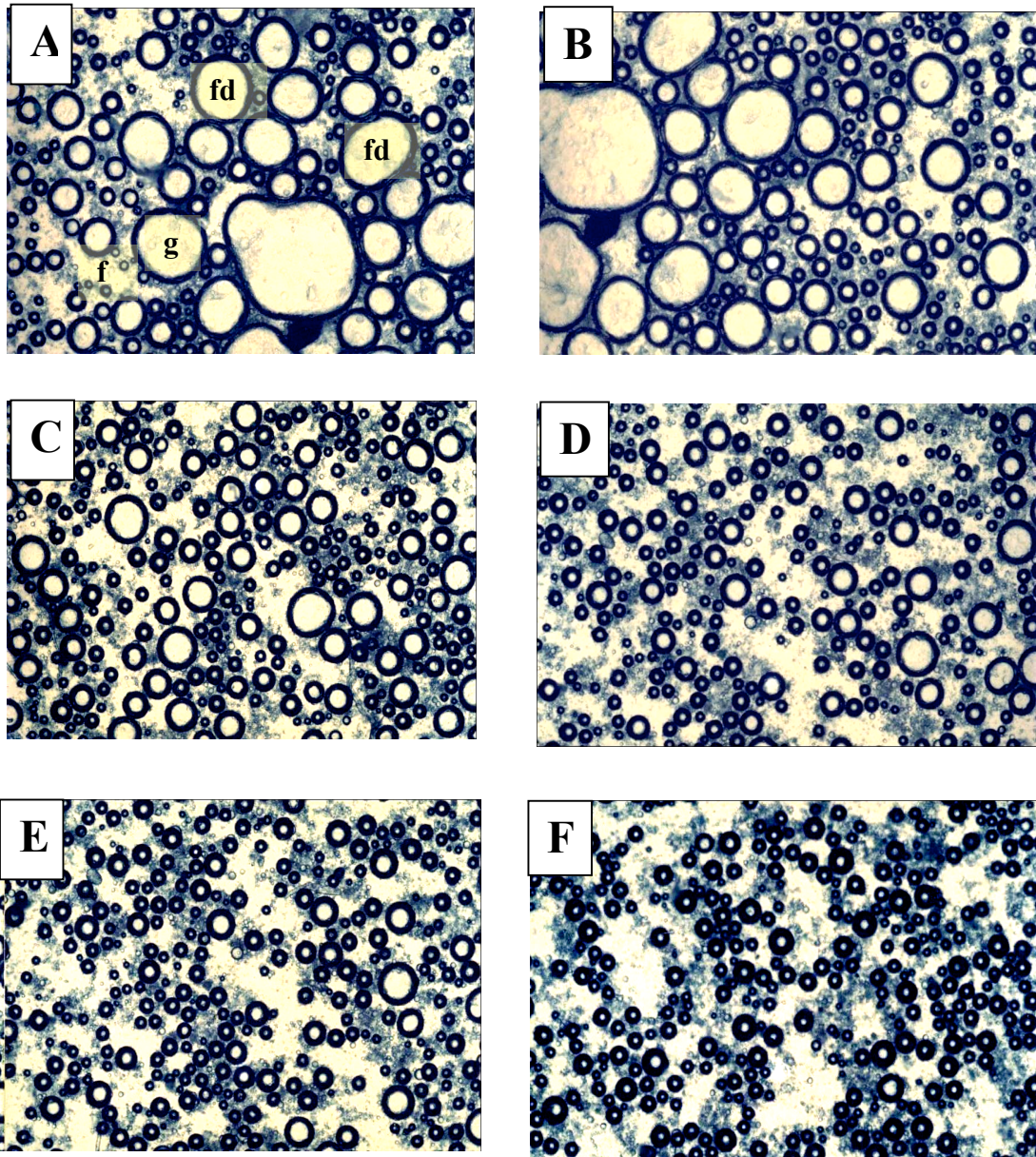


Figura 64. Emulsiones diluidas O/W con proteínas miofibrilares de cazón y cerdo, a diferentes tiempos de homogenización.

A: cazón, 1 min

B: cerdo, 1 min

C: cazón, 3.5 min

D: cerdo, 3.5 min

E: cazón, 5 min

F: cerdo, 5 min

g: glóbulo de grasa estabilizado con proteína; fa: fase acuosa o continua; fd: fase dispersa

Se observó que las emulsiones concentradas obtenidas con un tiempo de homogenización de 5 min son polidispersas figura 63A y B

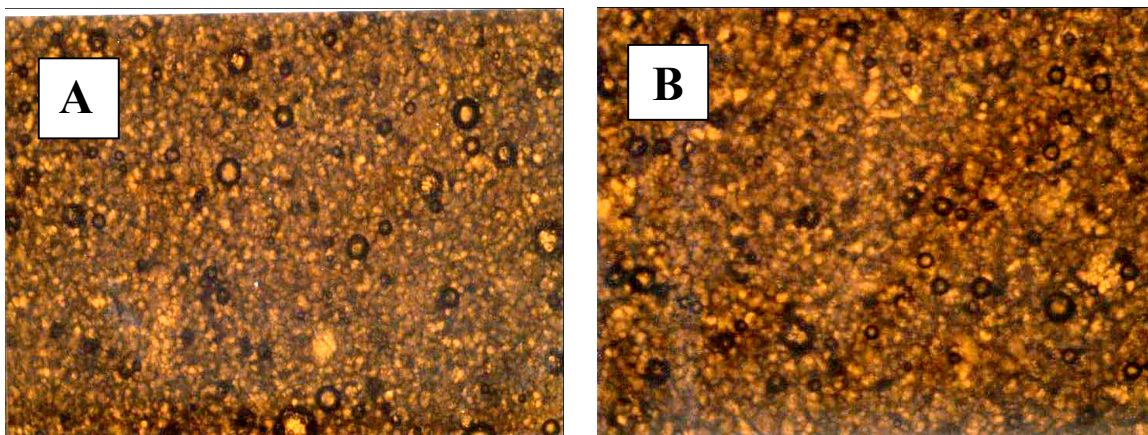


Figura 65. Emulsiones concentradas O/W con proteínas miofibrilares a 5 min de homogenización. A) Proteínas de cazón; B) proteínas de cerdo

El hecho de que los tamaños de gota hayan sido menores en el cerdo que en cazón, no están relacionados únicamente al tipo de especie que derivan, si no a dos factores importantes. El primero se debe a las condiciones de homogenización en la elaboración de emulsiones, ya que a periodos más largos de tiempo de homogenización disminuyen el tamaño de partícula. El segundo factor se relaciona con la calidad funcional que presentan las proteínas miofibrilares, en cuanto a la actividad superficial, lo cual se ve reflejada en una rápida estabilización de las gotas sin coalescer una vez formadas (McClements, 1999a).

En conclusión el tamaño de partícula encontrado durante la homogenización depende del balance que existe entre el tiempo en que la proteína se adsorbe en la interfase y el tiempo de colisiones entre gota y gota, por lo que a mayor tiempo de homogenización menor tamaño de partícula.

6.5. Geles

6.5.1 Fuerza de penetración

La figura 66 muestra el trabajo de penetración en geles formado por calentamiento de las emulsiones proteicas.

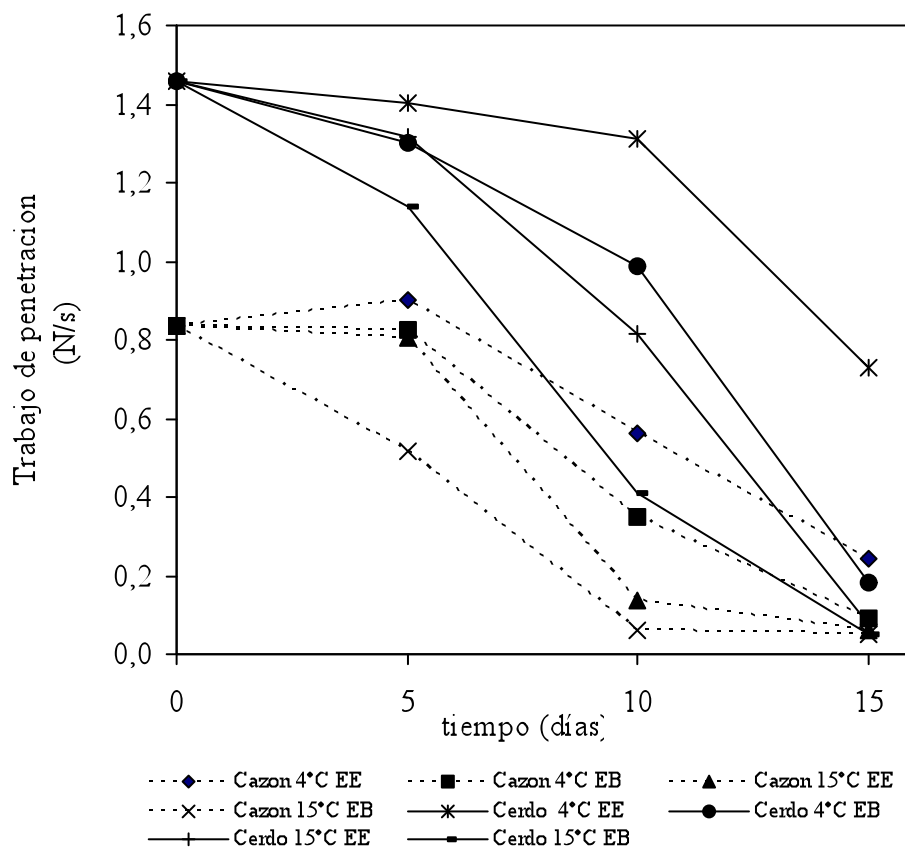


Figura 66. Trabajo de penetración en geles proteicos de cazón y de cerdo

Los geles proteicos de cerdo presentaron mayor dureza ($P < 0.001$), reportada como trabajo de penetración, que los de cazón, con un valor medio en la especie de 0.4962 N/s y 0.9720 N/s, para cazón y cerdo, respectivamente (Anexo X).

Las diferencias que existieron en cuanto a la dureza de los geles entre cerdo y cazón se debe a la degradación proteica de cazón, por la gran cantidad de enzimas proteolíticas presentes en animales marinos (Cheret y col., 2007), razón por la cual el cazón presentó menor trabajo de penetración en las muestras que el cerdo. Aun cuando en la práctica los animales marinos son utilizados para formar geles alimenticios, éste presenta problemas en la producción, de ahí que varios autores (Álvarez y col., 1999; Ramírez y col., 2002) se han enfocado al estudio de la inactivación de proteasas adicionando inhibidores como un ingrediente en la formación de geles alimentarios, para evitar así el efecto modori, el cual

es atribuido a las proteasas endógenas. El término modori es utilizado para describir la degradación de un gel proteico de origen marino que está asociado con la incubación a temperaturas entre los rangos de 50-70 °C (Vissessanguan y col., 2001), dando como consecuencia un daño irreversible en la estructura del gel, ya que se observa un decremento en la fuerza del gel, no consistente y no elástico (Ramírez y col., 2002), concluyendo que algunas proteasas endógenas son reactivadas a temperaturas arriba de su punto óptimo. Éste hecho podría deducir que el efecto modori estuvo presente, pero se sugiere el uso de inhibidores para verificar éste hecho.

Se observó una diferencia significativa con respecto al tiempo ($P < 0.001$), disminuyendo el trabajo de penetración en geles de cazón conforme el paso del tiempo de estudio y aparentemente estuvo relacionada con la alta actividad enzimática que presentó el cazón. La influencia de la temperatura y el tratamiento, se ven involucradas en la actividad proteolítica y así también estos influenciaron en el trabajo de penetración, concluyéndose que a mayor actividad proteolítica, menor trabajo de penetración, ya que las muestras obtenidas de material almacenados a 4°C fueron significativamente ($P < 0.001$) más duras que las almacenadas a 15°C (1.1041 N/s y 0.8400 N/s, a 4 y 15°C, respectivamente) (Anexo VIII). El tipo de tratamiento (EE y EB) afectó significativamente a la dureza de los geles de cerdo y cazón; las enzimas endógenas produjeron un trabajo de penetración medio de 1.0704 N/s y 0.5462 N/s, respectivamente, mientras que las muestras tratadas con el extracto enzimático de *P. fluorescens* mostraron un trabajo de penetración de 0.8737 N/s y 0.4462 N/s para cerdo y cazón, respectivamente (Anexo VIII).

Si se comparan estos valores con los resultados de degradación proteica, se puede concluir que el menor trabajo de penetración se debe a la alta actividad proteolítica reportada en las secciones 6.2.1 y 6.3.3

Las muestras estudiadas presentaron un intervalo bajo de trabajo de penetración con respecto a geles de otros coloides debido a las características de la materia prima usada. Por un lado, las proteínas miofibrilares y la grasa utilizada para emulsificar a las proteínas, la cual es líquida a temperatura ambiente y no un sólido como el lardo, que comúnmente se utiliza en la elaboración de productos cárnicos.

6.5.2. Microscopía de barrido electrónico (SEM) de geles

La SEM se realizó a las emulsiones gelificadas de acuerdo a la sección 5.7.1. Éste tipo de análisis es una herramienta para observar el comportamiento de la proteína y el tamaño de partícula en el sistema. Las figuras 67 y 68 muestran las micrografías de geles hechos a partir de emulsiones proteicas de cazón y cerdo, a tiempo cero y a 15 días de almacenamiento. En éstas, se observan glóbulos de aceite estabilizados con una película proteica interfacial, así como una matriz formada por la interacción proteína-proteína-glóbulo de grasa.

Al principio del estudio las emulsiones gelificadas de ambas especies, tenían glóbulos más pequeños, lo que coincide con los resultados encontrados en la determinación del tamaño de partícula (Sección 6.4.1 y el análisis por microscopía óptica de las muestras (Sección 6.4.5), en el que el tiempo cero mostró menores tamaños de partícula.

Con respecto a la temperatura, se observó la disminución del tamaño de partícula, ya que a 4°C, las muestras mostraron menor tamaño que ha 15°C.

El efecto del tratamiento también tuvo efecto en el tamaño de partícula ya que las muestras tratadas con enzima endógenas (EE) mostraron tamaños menores que las muestras expuestas con enzima bacteriana (EB).

En la figura 65, se muestran las muestras a 4 y 15° con 15 días de almacenamiento, bajo los dos tratamientos estudiados y comparados con el tiempo cero.

Se puede observar, que a 4°C, que las muestras tratadas con EE (figura 67B) el tamaño del glóbulo era menor que en las muestras tratadas con EB (figura 67C). En muestras con EE almacenadas a 15°C se observó una reducción en el tamaño de glóbulo (figura 67 D), el tratamiento de éstas muestras con EB aumentó el tamaño de glóbulo (67E). Lo anterior está relacionado con la calidad funcional en las propiedades emulsificantes que presentaron las

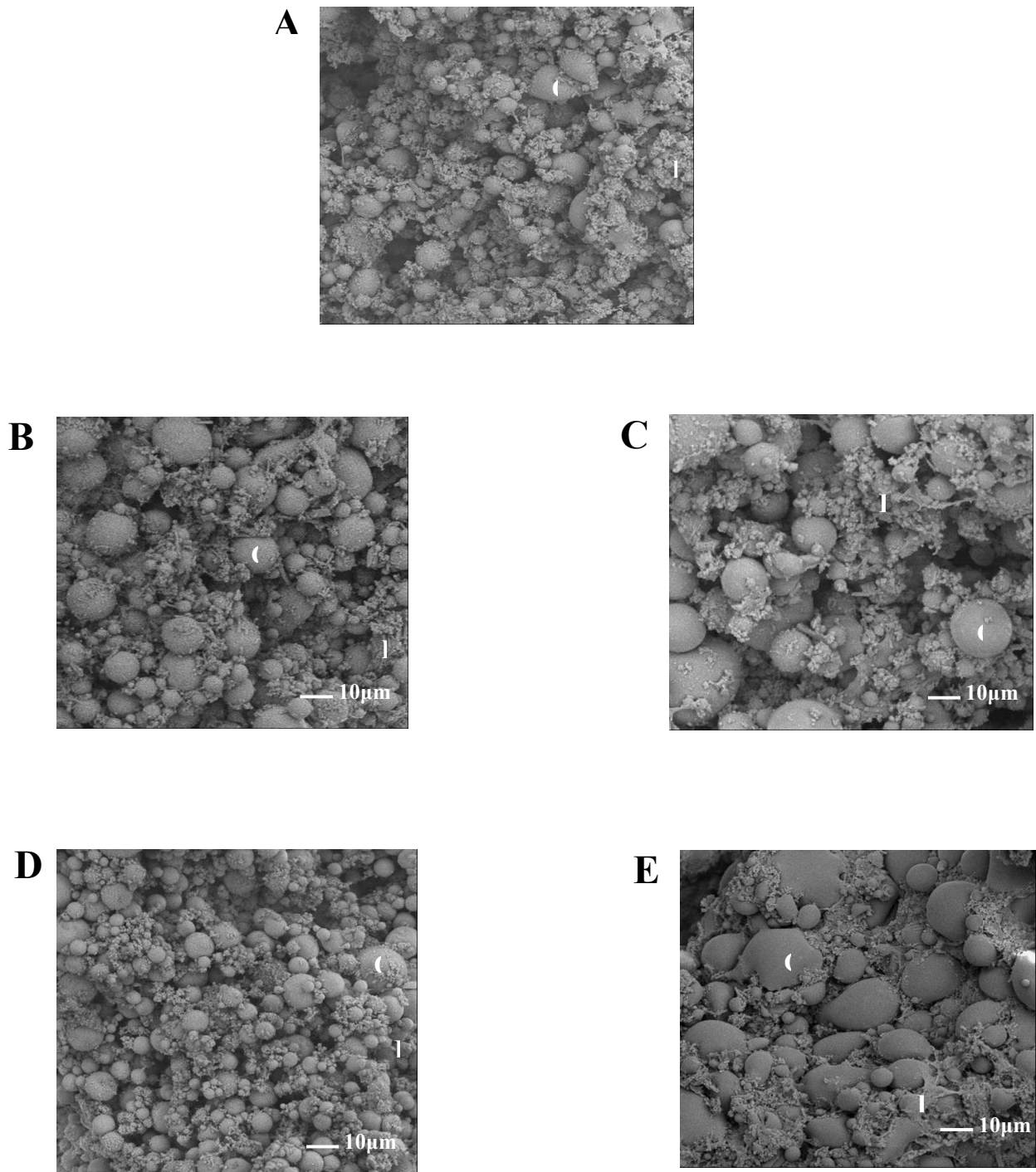


Figura 67. Micrografías (500x) de geles de cazón a 0 y 15 días de almacenamiento

A: $t=0$; B: EE, 4°C; C: EB, 4°C; D: EE, 15°C; E: EB, 15°C

G: glóbulo de aceite estabilizado con proteína miofibrilar; P proteína miofibrilar.

proteínas miofibrilares del cazón ya que con respecto al tiempo, la capacidad que tuvieron las proteínas de cazón al emulsionar aceite fue más corto que en muestras de cerdo (Sección 6.3.1).

El aumento del tamaño del glóbulo al parecer se relaciona con la actividad enzimática no controlada (EB), en el que la temperatura y el tratamiento tuvieron efecto. En las pruebas de actividad enzimática las muestras analizadas presentaron mayores valores a 15°C con ambos tratamientos, que a 4°C (Sección 6.2.1). Por lo tanto al existir una mayor hidrólisis de proteínas, la velocidad de llegar a la superficie del glóbulo de grasa durante la homogenización es más rápida, sin embargo, al parecer la capa proteica alrededor del glóbulo no es lo suficientemente fuerte para mantenerse los glóbulos sin coalescer. Lo anterior queda sustentado en el análisis de cada una de las fases (Sección 6.4.3) donde los electroforetogramas y los densitogramas muestran degradación de la zona I, en proteínas adsorbidas en la interfase la cual es correspondiente a la miosina.

La figura 68 muestra las microfotografías de geles hechos a partir de emulsiones proteicas de cerdo. En todos los tratamientos el tamaño del glóbulo fue más pequeño que en las muestras de cazón. Las muestras almacenadas a 15°C y a EB mostraron tamaño de glóbulo más grande.

En la figura 68 B se aprecia que el tamaño del glóbulo de las muestras a 4°C, y tratadas con EE fue similar a las muestras tratadas con EB (figura 68C). Éste hecho podría estar relacionado con el análisis molecular realizado por SDS-PAGE (Sección 6.3.3) donde los densitogramas reflejan que no hay cambios aparentes en la miosina, siendo ésta molécula considerada con más actividad superficial. Además que el estudio realizado de las fases en las emulsiones no mostraron diferencias en la zona I correspondiente a la miosina.

En muestras con EE almacenadas a 15°C mostraron una reducción en el tamaño de glóbulo (figura 68 D), el tratamiento de éstas muestras con EB aumentó el tamaño de glóbulo (68 E), debida posiblemente a la gran actividad proteolítica encontrada en la sección 6.2.1.

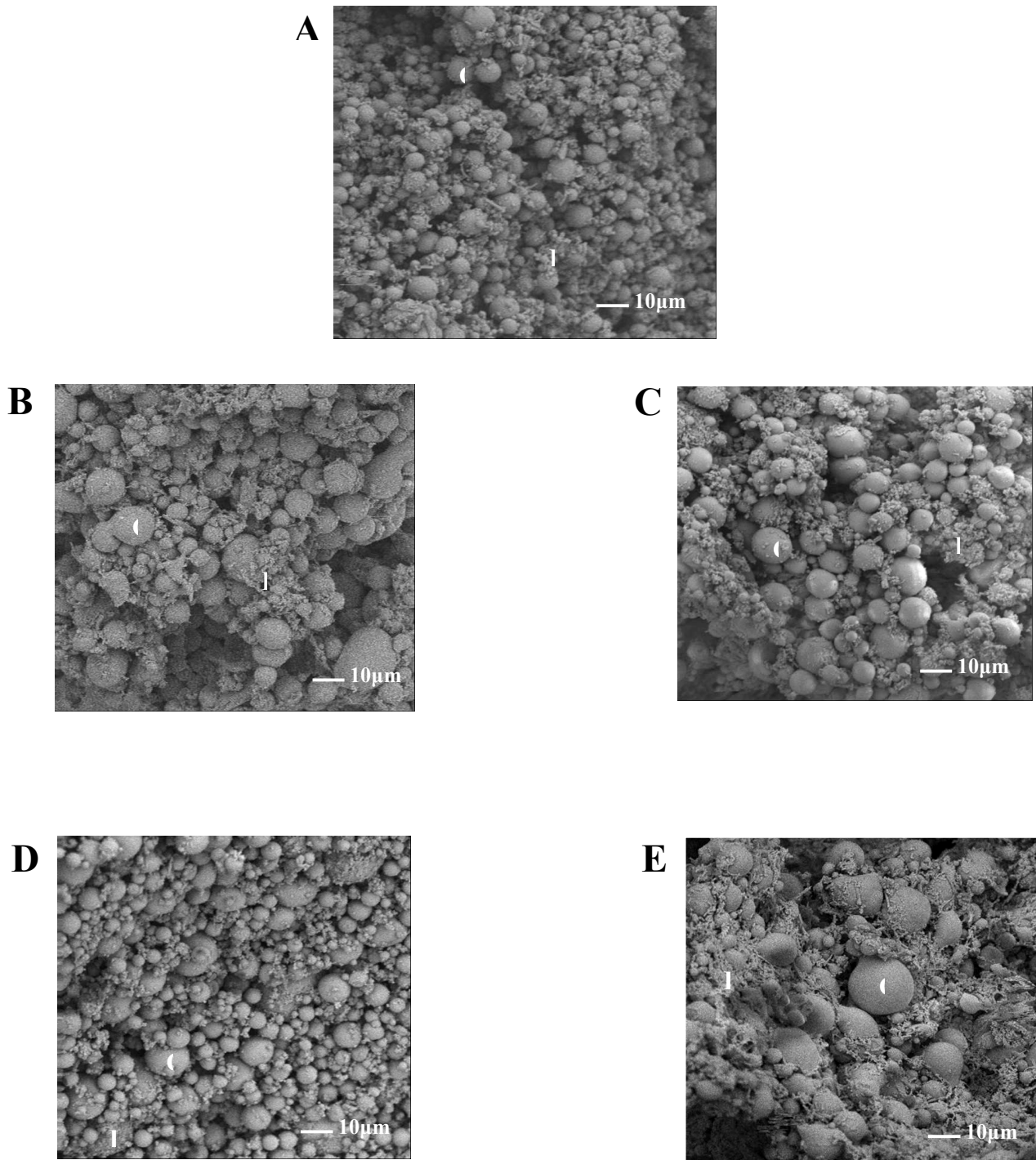


Figura 68. Micrografías (500x) de geles de cerdo a 0 y 15 días de almacenamiento

A: t=0; B: EE, 4°C; C: EB, 4°C; D: EE, 15°C; E: EB, 15°C

G: glóbulo de aceite estabilizado con proteína miofibrilar; P proteína miofibrilar.

Los resultados anteriores muestran que el mayor tamaño del glóbulo de geles proteicos de cerdo en comparación con los de cazón influye en las propiedades emulsificantes de las proteínas miofibrilares al formar la capa interfacial, viéndose reflejado desde las propiedades emulsificantes.

No se descarta de ninguna manera que también el efecto de coalescencia o ruptura de glóbulos, pudo haberse presentado durante el calentamiento gradual en la formación del gel a partir de la emulsión cárnica, ya que muchos autores han sugerido rupturas durante éste proceso térmico gradual (Jones y Mandingo, 1982; Gordon y Barbut, 1992 a y b) en el que glóbulos estabilizados con proteínas forman poros como puntos “chimenea”, liberando vapor de agua. A diferencia de otros estudios donde la fase lipídica es grasa animal, en éste caso la fase lipídica es líquida por lo que probablemente durante el calentamiento del sistema y tener contacto glóbulo-glóbulo cuya capa proteica es muy débil debida a las cadenas de polipéptidos cortos, ésta capa podría haberse roto dando como consecuencia transporte de materia entre ellos y después un sellado por coagulación-agregación de proteínas por sistema térmico.

7. Conclusiones

El pH óptimo de actividad proteolítica para las enzimas endógenas extraídas de muestras de cazón fueron 6 y 7; durante un tiempo de 10 minutos.

El pH óptimo de actividad proteolítica para las enzimas endógenas extraídas de muestras de cerdo fue a 4, 6 y 7; a 10 minutos.

La actividad enzimática para ambas especies tuvo aumento durante el tiempo de estudio, viéndose reflejado en los análisis moleculares.

La actividad enzimática de la carne inoculada con enzima microbiana fue mayor a 15°C que a 4°C.

En ambas especies se observó crecimiento microbiano, como indicativo de contaminación sobre el manejo durante el despiece, el valor de ufc de enterobacterias y psicrótrofos fue mayor a 15°C, aunado a esto un aumento en la concentración en aminos biogénicos las cuales son compuestos de indicativo de calidad.

Las proteínas de muestras de cazón, de acuerdo a los densitogramas obtenidos, mostraron diferencias más marcadas que las de cerdo, lo que se relaciona con la actividad enzimática. Por otro lado, el pH alto en estas muestras y la variación en los grupos sulfhidrilos permiten suponer que las proteínas de cazón se desestabilizan con mayor facilidad que las de cerdo por acción enzimática.

Se encontraron altos valores de viscosidad en muestras de cerdo que en el cazón lo cual se debe a que se han encontrado diferentes niveles de funcionalidad entre especies ya que se han mostrado diferentes grados de interacción intermolecular entre especies terrestres y marinas y aunado a esto la naturaleza de las moléculas en este caso las proteínas.

Al realizar las emulsiones, la de cerdo tuvo menor tamaño de partícula que las de cazón a todos los tiempos estudiados, esto se relaciona con el tamaño de partícula observado en las muestras por microscopia óptica y de barrido, así también con las propiedades emulsificantes ya que las proteínas de cerdo fueron más estables que las de cazón.

En concordancia con los resultados obtenidos en las propiedades de emulsificación, las emulsiones proteicas de cerdo tuvieron mayor viscosidad que las de cazón.

Hubo cambios en el comportamiento de las proteínas miofibrilares en la interfase en ambas especies, atribuidas a la acción proteolítica, observándose en SDS-PAGE, la concentración de proteína en la fase acuosa, IEE, y -SH.

Los hidrolizados en los productos marinos son recomendados tanto para mejorar la calidad de asimilación de las proteínas en la digestión; a la vez, estos ayudan a las propiedades funcionales en la elaboración de productos y texturizados cárnicos. Es recomendable el uso de una proteólisis controlada para lograr estos fines. Sin embargo no se descarta el uso del cazón como materia prima para elaborar un producto cárnico emulsionado, con la ventaja de incluir grasas de origen marino.

En la elaboración de la emulsión, la proteína miofibrilar de cerdo adsorbida en la interfase tuvo un comportamiento similar durante el tiempo de estudio, no así en el cazón. Probablemente a que los extractos de proteínas miofibrilares de cazón presentaron menores valores de capacidad de emulsión, pero mayor estabilidad de la emulsión que el cerdo; se podrían aplicar como ayuda en la estabilización de emulsiones, particularmente en la producción de productos cárnicos al igual que el cerdo.

La estabilización de la emulsión es también debida al comportamiento espacial de las proteínas, si estas son alteradas también lo será la interacción proteína-lípido. En este caso, entre mayor sea la actividad enzimática, más marcado será el decremento en la capacidad de emulsificación y la estabilidad del sistema.

Los resultados obtenidos en los estudios de distribución de las proteínas en las fases de las emulsiones modelo sugirieron que la degradación de las proteínas miofibrilares fue dependiente del tiempo y la temperatura de almacenamiento, observándose este hecho en ambas especies, y siendo más marcado en las muestras de proteínas no adsorbidas en la interfase de ambas especies.

Las muestras de cazón presentaron un intervalo bajo de trabajo de penetración con respecto al cerdo. Así también estos geles presentaron un trabajo de penetración con respecto con otros coloides debido a las características de la materia prima usada. Por un lado, las proteínas miofibrilares y la grasa utilizada para emulsificar a las proteínas, es líquida a temperatura ambiente y no un sólido como el lardo, que comúnmente se usa en la elaboración de productos cárnicos.

8. Recomendaciones y Perspectivas

Tener en consideración el estadio fisiológico del cazón, ya que en especies marinas varía la actividad proteolítica.

Evaluar el estudio a temperaturas de congelación y ultracongelación, y observar así efecto en la formación de emulsión.

Control de hidrólisis de los extractos y sustratos musculares.

Realizar el estudio de actividad proteolítica sobre un extracto proteico miofibrilar y ser comparado con el sustrato muscular para confirmar el efecto de enzimas endógenas.

El uso de inhibidores de tipo vegetal y de grado analítico sobre un tipo específico de enzimas, para observar el efecto de la formación de emulsión y de la formación del subsecuente gel, para evitar el efecto modori.

Realizar zimogramas de las enzimas endógenas de cazón, sobre proteínas miofibrilares debido a su alta actividad proteolítica, lo que llevaría a una purificación parcial de las enzimas.

La electroforesis (SDS-PAGE) es utilizada como una herramienta para la identificación de especies por medio de la localización de proteínas con base en su peso molecular, pero es necesario un estudio mas detallado para separar mejor las proteínas e identificarlas más detalladamente por el peso molecular y quizá utilizando electroforesis en 2 D, pueda ayudar a identificar las proteínas en el sistema con ayuda de su punto isoeléctrico.

A pesar de que en el presente trabajo no se realizaron análisis de proteínas de alto peso molecular seria muy importante el estudiar la participación de estas en la formación de una emulsión para comparar con los resultados de Mitsuhashi y col. (2002).

La utilización de varias fuentes lipídicas y comparar su efecto, en la formación de una emulsión con sustratos hidrolizados y la subsecuente formación de gel.

El estudio reológico de las muestras hidrolizadas y de las emulsiones formadas.

Evaluar el comportamiento de las proteínas durante la escala gradual de temperatura en la formación de gel.

Evaluar la hidrofobicidad superficial del extracto proteico.

Perspectivas del trabajo:

El presente trabajo podría ser la base de futuros proyectos aplicativos y de ciencia básica. A continuación se proponen algunos, según la experiencia adquirida.

La utilización de la enzima de *Pseudomonas fluorescens*, en la elaboración de hidrolizados controlados de pescado, y ser utilizados como ingredientes funcionales en alimentos, alimentos texturizados para consumo humano y animal, fertilizantes etc.

La formación de un producto cárnico proteico-emulsionado a partir de cazón, y/o de la integración de especies, quizás: animal-vegetal (cazón-soya); animal-animal (cazón-cerdo); animal-algas (cazón-algas) que pueda tener una alto contenido proteico y funcional.

La utilización de sustratos cárnicos (cerdo y /o cazón) hidrolizados y su efecto con enzimas “enlazantes”, en la formación de productos cárnicos.

La elaboración de películas emulsionadas a base de proteínas miofibrilares de especies marinas.

9. Bibliografía

- Ababouch L, Afilal M.N, Benabdeljelil H y Busta FF. 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 26(3):297-306.
- Acton, J.C., Ziegler, G.R. y Burge, D.L. 1983. Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2):99-121.
- Aguilera, J.M. 2001. Tamaño y forma de partículas. En: Métodos para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Editores, De Dios, J.A. y Aguilera, J.M. Acribia, Zaragoza. pp 29-48.
- Aguilera, J.M. y Stanley, D.W. 1999. Image Analysis. En: Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. Editores: Aguilera, J. M. y Stanley, D. W. Aspen Publishers. Maryland. pp 71-91.
- Alanís-García, E. 2003. Purificación y Caracterización de una Proteasa de *Pseudomonas spp.* Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Alanís-García, E., Lara, P. y Guerrero Legarreta, I. 1999. Proteolytic activity of four strains of *Pseudomonas* sp. on crude extracts of contractile proteins. *Food Chemistry*, 67:45-51
- Alford, J.A., y Elliot, L.E. 1960. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperature. I. Action of *Pseudomonas fluorescens* on lard. *Food Research*, 25:296-303.
- Alichanidis, E. y Andrews, A.T. 1977. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR 11. *Biochemica et Biophysica Acta*, 485:424-433.
- Al-Malah, K.I., Azzam, M.O.J y Omari, R.M. 2000. Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique. *Food Hydrocolloids*, 14:485-490.
- Álvarez, C., Couso, I., y Tejada, M. 1999. Thermal gel degradation (modori) in sardine surimi gels. *Journal of Food Science*, 64(4):633-637.
- An, H., Polla, Hartley, P.S. Fan, X y Morrissey M.T. 1995. Activity staining of pacific whiting (*Merluccius products*) protease. *Journal Food Science*, 60: 1228-1232.
- An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T.A., y Morrissey, M.T. 1994. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *Journal of Food Science*, 59: 1013-1017,1033.
- An. H., Wei, C.I., Zhao, J., Marshall, M.R., Lee, C.M. 1989. Electrophoretic identification of fish species used in surimi products. *Journal of Food Science*, 54:253-257.
- Anderson, C. 1991. Cholera epidemic traced to risk miscalculation. *Nature*, 354:255-255.
- Anderson, T.F. 1951. Techniques for preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for electron microscope. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 13:130-134.

- Anson., M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22:79-89.
- Ansorena, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R., Enrola, S., Rizzo, A., Raemaekers M. y Demeyer D. 2002. Analysis of biogenic amines in northern an southern European sausages and role in ammine production. *Meat Science*, 61:141-147.
- Asghar, A., Samejima, K. y Yasui. T. 1985. Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22:27-106.
- Bani-Jaber, A., McGuire, J., Ayres, J.W. y Daeschel, M.A. 2000. Efficacy of the antimicrobial peptide nisin in emulsifying oil in water. *Journal of Food Science*, 65(3):502-506.
- Barbut, S. 1989. Effect of three chloride salts and chopping time on the microstructure and texture of meat batters. *Canadian Institute of Food Science and Technology*, 22(3):284-290.
- Barbut, S. y Mittal, G.S. 1990 Effect of heating rate on meat batter stability, texture and gelation. *Journal of Food Science*, 55:334-337.
- Barrett, A. 1980 Cathepsin G. *Methods in Enzymology*. 80:561-565.
- Barrett, A. J. 1986, The classes of proteolytic enzymes. En: *Plant Proteolytic Enzymes* Editor, M.J. Dalling. CRC Press, Boca Raton. pp 1- 16.
- Barroso, M., Careche, M. y Borderías A.J. 1998. Quality control of frozen using rheological techniques. *Trends in Food Science and Technology*, 9:223-229.
- Bart, G., Frame, M. J., Carter, R., Coombs, G.H., Mottram, J.C. 1997. Cathepsin B-like proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88:53-61.
- Bauer, F., Seuss, I., Paulsen, P. y Vali, S. 1994. The formation of biogenic amines in meta and meta products. En 40th International Congress of Meat Science and Technology, La Haya, Holanda. S.-V.25, p.1-7.
- Beatty, S.A. y Collins, V.K. 1940. Studies of fish spoilage. VI Breakdown of carbohydrates, proteins and amino acids during spoilage of cod muscle press juice. *Journal of the Fisheries Research Board Canada*, 4:412-423.
- Benner, R.A., Staruszkiewicz, W.F., Rogers, P.L. y Otwell, W.S. 2003. Evaluation of Putrescine, Cadaverine, and indole as chemical indicators of decomposition in penaeid shrimp. *Journal of Food Science*, 68(7): 2178-2185.
- Bird, J.W.C., Carter, J.H., Triemer, R.E., Brooks, R.M. y Spanier, A.M. 1980. Proteinases in cardiac and skeletal muscle. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 39: 20-25.
- Boles, J.A., Parrish Jr. F.C., Huiatt, T.W. y Robson, R.M., 1992. Effect of porcine stress syndrome on the solubility and degradation of myofibrillar cytoskeletal proteins. *Journal of Animal. Science*, 70:454-464.
- Bond, J.S y Butler, P.E. 1987. Intracellular proteases. *Annual Reviews Biochemistry*, 56:333-364.

- Borchet, L., Greaser, M.L., Bard, J.C., Cassens, R.G. y Briskey, E.J. 1967. Electron microscopy of meat emulsion. *Journal of Food Science*, 32:419-421.
- Borderías, A. J., Jimenez-Colmenero, F y Tejada, M. 1985. Parameters affecting viscosity as a quality control for frozen fish. *Marine Fisheries Review*, 47:43-45.
- Borderías., A.J. , Lamua, M y Tejada, M. 1983. Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. *Journal of Food Technology*, 18:355-365.
- Borejdo, J. 1983. Mapping of hydrophobic sites on the surface of myosin and its fragments. *Biochemistry*, 22:1182-1187.
- Borton, R. J., Bratzler, L.J., y Price J. F. 1970. Effects of four species of bacteria on porcine muscle. II electrophoretic patterns of extracts of salt-soluble. *Journal of Food Science*, 52(35):783-786.
- Bosilevac, J. M., Arthur, T. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Rossman, M., Reagan, J. y O., Koohmaraie, M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and levels of aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* are reduced when hides are washed and treated with cetylpyridinium chloride at a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, 67: 646-650.
- Bosilevac, J. M., Nou, X., Osborne, M. S., Allen, D. M. y Koohmaraie, M. 2005. Development and evaluation of an on-line hide decontamination procedure for use in a commercial beef processing plant. *Journal of Food Protection*, 68: 265-272.
- Bourne, M.C. 1982. Practice of objective texture measurement. En: *Food Texture and Viscosity*. Academic Press, Nueva York pp. 119–143.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, 57: 215-221.
- Bozkurt, H., y Erkmen, O. 2004. Effects of temperature, humidity and additives on the formation of biogenic amines in sucuk during ripening and storage periods. *Food Science and Technology International*, 10(1):21-28.
- Brackett, R.E. 1992. Microbiological safety of chilled foods: current issues. *Trends in Food Science and Technology*, 3:81-85.
- Brown, D.D. y Toledo, R.T. 1975. Relationship between chopping temperatures and fat and water binding in comminuted meat batters. *Journal of Food Science*, 40:1061-1064.
- Brown, R.G.W. 1990. Miniature laser light scattering instrumentation for particle size analysis. *Applied Optics*, 29(28):1.
- Bucky, A. R., Robinson, D. S. y Hayes, P.R. 1987. Factors affecting the heat stability of lipase produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Food Chemistry*, 23:159-173
- Byun, J. S., Park, K.S., Oh, D.H., Kim, J. W. y Lee, M. 2000. Comparison of indicators for microbial quality of meat during aerobic cold storage En 45th International Congress of Meat Science and Technology, Buenos Aires, Argentina, pp 734-735.
- Caffrey, C.R. Ruppel, A. 1997. Affinity isolation and characterization of the B-like proteinase Sj31 from *Schistosoma japonicum*. *Journal of Parasitology*, 83:1112-1118.

- Cao, M.J., Hara, K., Osatomi, K., Tachibana K., Izumi, T. y Ishihara, T. 1999. Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. *Journal of Food Science*, 64 (4):644-647.
- Carballo, B y Lopez de Torre, G., 1991. Bioquímica de la carne. En: Manual de Bioquímica y Tecnología de la carne. Madrid Vicente, Madrid. pp-15-58.
- Carlson, J.K. y Baremore, I.E. 2004. Changes in biological parameters of Atlantic sharpnose shark *Rhizoprionodon terraenovae* in the Gulf of Mexico: evidence for density-dependent growth and maturity?. *Marine and Freshwater Research*, 54:227-234.
- Castillo, A., Lucia, L. M., Kemp, G. K., y Acuff, G. R. 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on beef carcass surfaces using acidified sodium chlorite. *Journal of Food Protection*, 62: 580-584.
- Castillo, A., McKenzie, K. S., Lucia, L. M., y Acuff, G. R. 2003. Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on beef carcass surfaces. *Journal of Food Protection*, 66: 775-779.
- Castro, J.I. 1987. The position of sharks in marine biological communities. En: Sharks, an Inquiry in to Biological Behavior, Fisheries and Use. Editor, S.Cook. Oregon State University Extension Service, Corvallis. pp: 11-17.
- Castro, J.I. 1993. The shark nursery of Bull Bay, South Carolina, with a review of the shark nurseries of the southeastern coast of the United States. *Environmental Biology of Fishes*, 38:37-48.
- Chambers, J.J., Reville, J.W. y Zeece, G.M. 1994. Lysosomal integrity in post mortem bovine skeletal muscle. *Sciences des Aliments*, 14:441-457.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., y Lorient, D. 1989. Proteínas Alimentarias. Bioquímica, Propiedades Funcionales, Valor Nutricional y Modificaciones Químicas. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 141-162.
- Chen, C. S., Hwang, D. C., y Jiang, S. T. 1989. Effect of storage temperature on the formation of disulfide bonds and denaturation of milkfish (*Chanos chanos*) myosin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*.37, 1228–1231.
- Chen, T.Y., y Hwang, D.F. 2002. Electrophoretic identification of muscle proteins in 7 puffer species. *Journal of Food Science*, 67(3):936-941.
- Cheret, R., 2005. Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson. Tesis de Doctorado. Universidad de Nantes. Nantes, Francia.
- Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton M. y Verrez-Bagnis V. 2007. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4):1474-1479.
- Chiralt, B.A., Martínez, N.N. y Camacho, V.M.M. 1998. Caracterización coloidal de algunos alimentos. En: Laboratorio de Coloides en Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. pp 7-14.
- Chou, D.H. y Morr, C.V. 1979. Protein water interactions and functional properties. *Journal of the American of Oil and Chemists Society*, 56(1):53A-62A.

- Church, N. 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science and Technology* 5:345-352.
- Chytiri, S.; Paleologos, E.; Savvaidis, I.; Kontominas, M. G. 2004. Relation of Biogenic amines with Microbial and Sensory changes of whole and filleted Freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection*, 67 (5): 960-965.
- Claeys, E., Uytterhaegen, L., Buts, B. y Demeyer, D. 1995 Quantification of Beef Myofibrillar Proteins by SDS-PAGE. *Meat Science*, 39:177-193.
- Cofrades S., Careche, M, Carballo J y Jimenez-Colmenero.F. 1993. Protein Concentration, pH and ionic strength affect apparent viscosity of actomyosin. *Journal of Food Science*, 58(6):1269-1993.
- Cofrades, S., 1994. Funcionalidad y características fisico-químicas de actomiosina procedente de distintas especies. Influencia de la congelación y conservación en estado congelado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad Farmacia, España.
- Cofrades, S., Bañon, S., Carballo, J., y Jiménez-Colmenero, F. J. 2003. Role of cathepsin D activity in gelation of chicken meat heated under pressure. *Food Chemistry*, 80: 241–247.
- Cofrades, S., Carballo, J., Careche, M. y Jiménez-Colmenero, F. 1996. Emulsifying properties of actomyosin from several species. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29:379-383.
- Connell, J.J y Howgate, J.F. 1959. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. 6. Amino acid composition of cod myofibrillar proteins. *Biochemical Journal*, 71:83-86.
- Connell, J.J. 1960. Studies on the fish muscle. 7. Denaturation and aggregation of cod myosin. *Biochemical Journal*, 75:530-538.
- Cook, C.F., Meyer, E.W., Catsimpoilas, N. y Sipos, E.F. 1969. Physicochemical properties and consumer attributes of meat-soy food systems. *Proceedings European Meeting Meat Research Workers, Helsinki, Finlandia* 15:381-388
- Correia, L.R. y Mittal, G.S. 1992. Viscoelastic properties of meat emulsions . En: *Viscoelastic Properties of Foods*, Editores, Rao, M.A. and Steffe, J. F. Elsevier, Nueva York pp185-203.
- Cottin, P., Poussard, J. P., Desmazes, D., Gergescauld, H. y Ducastaing, A. 1991. Free calcium and calpain I activity. *Biochemica et Biophysica Acta* ,1079:139-140.
- Coupland, J.N y McClements, D.J. 2001. Droplet size determination in food emulsions:comparison of ultrasonic and light scattering methods. *Journal of Food Engineering*, 20:117-120.
- Croall, D.E. y McGrody, K.S. 1994. The domain structure of milli-calpain: mapping the binding site for calpastatin. *Biochemistry*, 33:13223–13230.
- Curt, C. 1994. Revue: méthodes d'évaluation de la stabilité des émulsions. Principe, applications, avantages et inconvénients. *Sciences des Aliments*,14:699-724.
- Cutter, C. N. y Siragusa, G. R. 1995. Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *Journal of Food Protection*, 58: 977-983.

- Dainty, R. H. y Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(S) 103–114.
- Dainty, R. H., Shaw, B.G., Deboer, K. A. y Scheeps, E. S.J. 1975. Protein changes caused by bacterial growth on beef. *Journal of Applied Bacteriology*, 39 (1): 73–84.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M. y Ramantanis, S.V. 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology*, 61(2): 117-123.
- Dalgleish, D.G 1997. Adsorption of protein and the stability of emulsions. *Trends in Food Science and Technology*, 8:1-6.
- Damodaran, S y Song, K.B. 1988. Kinetics of adsorption of protein at interfaces: Role of protein conformation in diffusional adsorption. *Biochemica et Biophysica Acta*, 954:253-264.
- Damodaran, S. 1989. Interrelationship of molecular and functional properties of Food proteins. En: *Food Proteins*. Editores, Kinsella, J.E. y Soncie, W.G. The American Oil Chemists Society Champaing, pp 21-51.
- Damodaran, S. 1990. Interfaces, protein films and foams. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34:1-79.
- Damodaran, S. 1994. Structure-function relationship of food. En: *Protein functionality in food systems*. Editores, Hettiachy, N.S. y Zieglet, G.R. Marcel Dekker Inc. Nueva Cork. pp.1-37
- Damodaran, S. 1996a. Functional properties. En: *Food Proteins: Properties and Characterization* Editor, R.Y. Yada, CRC Press, Boca Raton, Nueva York, pp. 167-234.
- Damodaran, S. 2005. Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3):54-66.
- Damodaran, S. y Anand, K. 1997. Sulfhydryl-disulfide Interchange-induced interparticle protein polymerization in whey protein-stabilized emulsions and its relation to emulsion stability. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45:3813-3820
- Damodaran., S. 1996b. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: *Food Chemistry*. Editor, Fennema, O. R., Marcel Dekker, Nueva York. pp 383-511
- Daniel, W.W. 1997. Análisis de varianza. .En: *Bioestadística :Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa, Noriega. México. pp 345-451.
- Dayton, W. R., Reville, W.J., Goll, D.E., y Stromer, M.H. 1976. A Ca²⁺ ion-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, 15:2150-2158.
- De Groot, S.J. 1999. Especies comestibles. En: *El pescado y los productos derivados de la pesca*. Editor Ruiten, A. Acribia., Zaragoza. pp 35-80
- Delbarre-Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noël, J., y Fleurence, J. 2000. Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) muscle : polymorphism and biochemistry studies. *Comparative. Biochemistry and Physiology B*, 125:83-95.

-
- Delbarre-Ladrat, C., Cheret, R., Taylor, R. y Verrez-Bagnis 2006. Trends in postmortem aging in fish: understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5): 409-421.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. y Fleurence, J. 2004. Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Food Chemistry*, 88(3):389-395.
- Demetriades, K. Coupland, J.N. y McClements, D.J. 1997 Physicochemical properties of whey protein stabilized emulsions as affected by heating and ionic strength. *Journal of Food Science*, 62:462-467.
- Deng, J.C., Toledo, R.T. y Lilliard, D.A. 1981. Protein-protein interaction and fat and water binding in comminuted flesh products. *Journal of Food Science*, 46:1117-1121.
- Dickinson, E. 1992. An introduction to food colloids. Oxford, University Press. pp. 95-97
- Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Reviews in Food Hydrocolloids*, 13:25-39.
- Dickinson, E. y Matsumura Y. 1991. Time-dependent polymerization of β -lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 (1):26-30.
- Dickinson, E., Murray, B. S., Satinsby, G. y Brock, C.J. 1987. Behaviour of adsorbed myosin at the oil-water interface. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9:302-304.
- Dimitrova, T. D., Leal-Calderón, F., Gurkov, T.D., y Campbell, B. 2004. Surface forces in model oil-in-water emulsions stabilized by proteins. *Advances in Colloids and Interface Science*, 108-109:73-86.
- Djenane D., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J. A. y Roncales, P. 2001. Extension of the retail display life of fresh beef packaging in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science*, 66: 181-186.
- Dobraszczyk, B.J. y Vincent, J. F. V. 1999. Measurement of mechanical properties of food materials in relation to texture: the materials approach. En *Food Texture, Measurement and Perception*. Editor. Rosenthal, A.J. Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland. pp 99-151.
- Dransfield, E., Etherington, D.J. y Taylor, M.A.J. 1992. Modelling post-mortem tenderisation. II: Enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Science*, 31:75-84.
- Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R., Wei, C. I. 2002. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Journal of Food Science*, 67 (1): 292-301.
- Dubal, Z. B., Paturkar, A. M., Waskar, V. S., Zende, R. J., Latha, C., Rawool, D. B. y Kadam, M. M. 2004. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science*, 66: 817-821.

- Dubin, G. 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 653–669.
- Dukhin, S y Sjöblom, J. 1996. Kinetics of Brownian and gravitational coagulation in dilute emulsions. En: *Emulsions and Emulsions Stability*, Editor, J. Sjöblom Marcel Dekker, Nueva York. pp. 41–180
- Eads, T.M. 1994. Molecular origins of structure and functionality in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 5:147-159.
- Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E. y Hirvi T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausage. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 76:575–577.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82:70-77.
- Eroski, 2006. El Tiburón:
http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/en_la_cocina/alimentos_de_temporada/2006/12/11/157761.php
- Etherington, D. J., Taylor, M.A.J., y Dransfield, E. 1987. Conditioning of meat from different species. Relationship between tenderising and the levels of cathepsin B, cathepsin L, calpain I, calpain II and beta glucuronidase. *Meat Science*, 20:1-14.
- Fairbairn, D. J. y Law, B.A. 1987. The effect on nitrogen and carbon sources on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, 62:105-113.
- Fan, S. G. y Wu, G.J. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46:273-292.
- FAO, 1981. <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/m2835e/m2835e00.html> The use of biological value of a protein in evaluating its quality for human. ESN: FAO/WHO/UNU/EPR/81/29
- Fellows, P. J. 1988. *Food Processing: Principles and Technology; Principles and Practice*, VCH Publishers, Weinheim, Alemania. pp.83-117
- Flores, J. y Bermell, S. 1985. Capacidad de emulsión de las proteínas miofibrilares. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 25(4):481-489.
- Focant, B., Jacob, M.F., y Huriaux, F. 1981. Electrophoretic comparison of the proteins of some perch (*Perca fluviatilis* L.) head muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2:295-305.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C., y Hultin, H.O. 1996. Characteristics in tissue muscular. En: *Food Chemistry*. Editor, Fennema, O. R., Marcel Dekker, Nueva York pp.1040-115.
- Forrest, C. J., Aberle D. E., Hedrick, B. H., Judge, D.M. y Merkel, A.R. 1975. *Fundamentos de Ciencia de la Carne*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 21,26,30-32,36-38; 59-66; 129-131.
- Fox, P. F., y Condon J. J. 1982. *Food proteins*. Editorial Applied Science Publishers, London and New York. pp 245-286.

- Franco, G. M.J., Diaz, C..M.D. y Ruiz, C. V. 1990. Métodos de análisis utilizados para la evaluación de proteínas. CINVESTAV, IPN. México. pp:68-69.
- Fritz, J.D. y Greaser, M.L. 1991. Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *Journal of Food Science*, 56: 607-610.
- Gallardo, J.M., Montemayor, M.L y Pérez-Martin, R. 1983. Formación de histamina en caballa (*Scomber scombrus*) y listado (*Katsuwonus pelamis*), especies de alto contenido en histidina libre. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 23 (2):269-275.
- Galluzo, S. J. y Regeinstein, J.M. 1978. Emulsion capacity and timed emulsification of chicken breast muscle myosin. *Journal of Food Science*, 43:1757-1760.
- García-Barrientos, R. 2001. Efecto de enzimas endógenas sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la carne de bovino durante la maduración. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- García-Lopez, M.L. Prieto, M. y Otero, A. 1998. The physiological attributes of Gram-negative bacteria associated with spoilage of meat and meat products. En: *The Microbiology of Meat and Poultry*. Editores. Davies, A. y Borrad, R. Blackie Academia and Professional. Gran Bretaña. pp. 1-34.
- García-Pérez, H.M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnostico*, 1(2):31-41.
- Garriga, M., Marcer, M. y Hugas, M. 1996. Microbiología de la carne fresca y productos cárnicos envasados. *Eurocarne*, (49):69-73.
- Gazzaz, S.S y Rasco, B.A. 1993. Parvalbumins in fish and their role as food allergens. A review. *Reviews in Fisheries Science*, 1(1):1-26.
- Gebre-Egziabher, A., Humbert, E.S. y Bluakenagel, G. 1980. Heat stable proteases from psychrotrophics in milk. *Journal Food Protection*, 45(5):444-452.
- Geesink, G., Morton, J., Kent, M., y Bickerstaffe, R. 2000. Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in postmortem proteolysis. *Journal of Food Science*, 65(8), 1318-1324.
- Genovese, M.I., Lajolo, F.M. y Añon, M.C. 2000. Determinación de grupos sulfhidrilo y disulfuro. En: *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Editores: Pilosof, M.R..A. y Bartholomai, B. G. EUDEBA. Argentina, pp.175-180.
- Gerelt, B., Ikeuchi, Y. y Suzuki, A. 2000. Meat tenderization by proteolytic enzymes after osmotic dehydration. *Meat Science*. 56 (3): 311-318.
- Gibson, D.M. 1992. Pathogenic microorganisms of importance in seafood. En: *Quality Assurance in the Fish Industry*. Elsevier Publishers, Amsterdam. pp.197-209.
- Gil M., Hortos M. y Sarraga C. 1998. Calpain and cathepsin activities, and protein extractability during ageing of longissimus porcine muscle from normal and PSE meat. *Food Chemistry*, 63(3):385-390(6).

- Gill, C. O., y Badoni, M. 2004. Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 43-50.
- Gill, C.O. 1986. The microbiology of chilled meat storage, Proceedings of the 24th Meat Industry Research Conference, Hamilton, Nueva Zelanda, MIRINZ publication 852, 210–213.
- Gill, C.O. y Penney, N. 1982. Bacterial penetration of muscle tissue. *Journal of Food Science*, 47(2):690-691.
- Girard, J.P. Denoyer, C. y Maillard T. 1991. El picado grosero. La reestructuración de las pastas finas. En *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Acribia, Zaragoza. pp. 231-295.
- Gobbetti, M., Smacchi, E., Stepaniak, L., Crea, F y Fox, P.F. 1998. Purification and characterization of an endopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *Journal of Food Biochemistry*, 22 (1): 17–35.
- Goll, D.E., Kleese, W.C. y Szpacenko, A. 1989. Skeletal muscle protease and protein turnover. En: *Animal Growth Regulation*, Editores, Campion, D., Hausman, G. and Martin, R. Plenum Press, Nueva Cork. pp. 141–182.
- Goll., D.E. 1991. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. *Reciprocal meat conference proceedings*, 44:25-33.
- Gomez-Guillen, M. C. y Batista, I. 1997. Seasonal changes and preliminary characterization of cathepsin D-like activity in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 32:255-260.
- Gómez-Moreno, C. 2003. Clasificación estructural de las proteínas. En: *Estructura de proteínas*. Ariel Ciencia. Editores: Gomez-Moreno, C. y Sancho, J. pp. 63-87.
- González-De-Liano, D., Cuesta, P. y Rodríguez, A. 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and *Leuconostoc* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 270–274.
- Gordon, A. y Barbut, S. 1992a. The effect of chloride salts on protein extraction and interfacial protein film formation in meat batters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(2):227-238.
- Gordon, A. y Barbut, S. 1992b. Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(4):299-332.
- Gordon, A. y Barbut, S. 1997. Meat batters: effect of chemical modification on protein recovery and functionality. *Food Research International*, 30(1): 5-11.
- Gornall A. J., Bardawill C. J., y David M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177:751-766.
- Granzier, H.L.M. y Wang, K. 1993. Gel electrophoresis of giant proteins: Solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*, 14:56-64.
- Grau, F.H. 1993. Microbial growth on fat and lean surfaces of vacuum-packed chilled beef. *Journal of Food Science* 48:326-328.

- Greer, G.G. 1989. Red meats, poultry, and fish. En: Enzymes of psychrotrophs in Raw Food McKellar, C.R. (Ed). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida p 270.
- Greer, G.G. y Jones, S.D.M. 1991 .Effects of lactic acid and vacuum packaging on beef processed in a research abattoir. Canadian Institute of Food Science and Technology, 24(3-4):161-168.
- Guan, D. y Hoover, D. G. 2005. Emerging decontamination techniques for meat. En: Improving the Safety of Fresh Meat Editor: Sofos, J. N. Woodhead Publishing Limited, CRC Press, Nueva York, pp 388-417.
- Guerrero-Legarreta, I. y Chávez-Gallardo, A.M. 1991. Detection of biogenic amines as meat spoilage indicators. Journal of Muscle Foods, 2(4):263-278.
- Guerrero-Legarreta, I., Ponce, A.E. y Pérez-Chabela, M.L. 2002. Parámetros fisicoquímicos en la calidad de carne y pescado. En: Curso practico de tecnología de carnes y pescado. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. pp. 11-18.
- Guroff, G., 1964. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. Journal of Biological Chemistry, 239:149-155
- Gurshin, C.W. y Szedlmayer, S.T. 2004. Short-term survival and movements of atlantic sharpnose sharks captured by hook-and-line in the north-east Gulf of Mexico. Journal of Fish Biology, 65:973-986.
- Haard, N.F. 1990. Enzymes from myosystems. Journal of Muscle Foods, 1:293-338.
- Haard, N.F. 2000. Seafood enzymes: The role of adaptation an other intraspecific factors. En Seafoods Enzymes. Ed. Haard, N.F. Marcel Dekker, Nueva York. pp.1-36.
- Haard, N.F. 2002. The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture.En Safety and quality issues in fish processing Editor. Bremner, H.A. Woodhead Publishing Limited. Boca Raton, Florida. pp. 220-286.
- Habeeb, A.F.S.A. 1972. Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Ellman's Reagent. Methods in Enzymology, 25, pp. 457-464
- Halász, A., Báráth, Á., Simon-Sakardi, L. y Hozalfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science and Technology, 5:42-49.
- Hamamoto, T., Kaneda, M., Horikoshi, K. y Kudo, T. 1994. Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. Applied and Environmental Microbiology, 60:3878-3880.
- Hamann, D.D. 1988. Rheology as a means of evaluating muscle functionality of processed foods. Food Technology, 42(6):66-71.
- Hamilton, M.A.E. y Ahmad, M.H. 1994. Isolation and characterization of *Pseudomonas* from processed chicken in Jamaica. Letters in Applied Microbiology, 18:21-23.
- Hansen, L.J. 1960 Emulsion formation in finely comminuted sausage. Food Technology, 14:565-569.
- Hara, K., Suszumatsu, A y Ishihara T. 1988. Purification and characterization of cathepsin B from carp ordinary muscle. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 54:1243-1252.

- Harder, W. 1979. Regulation of the synthesis of extracellular enzymes in microorganisms. *Society for General Microbiology Quarterly.*, 6:139-140.
- Harrington, W.F. y Rodgers M.E 1984. Myosin. *Annual. Review Biochemistry*, 53:35-73.
- Hauffman, V.L., Lee, C.K. y Burns, E.E. 1975. Selected properties of sunflower meal (*Heliantus annus*). *Journal of Food Science*, 40:70-74.
- Hayat, M.A. 1970. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Vol.1., Nueva York, Van Nostrand Reinhold Co.pp 241-319.
- Haynes, P.R. 1993. Microbiología e Higiene de los Alimentos. Acribia, Zaragoza. pp75-81
- Hegarty, G.R, Bratzler, L.J y Pearson, A.M. 1963. Studies on the emulsifying properties of some intracellular beef muscle protein. *Journal of Food Science*, 28:663-668.
- Heinze, H.P., y Bruggemann, D. 1994. Ageing of beef: influence of two ageing methods on sensory properties and myofibrillar proteins. *Sciences des Aliments*, 14:387-399.
- Henson, H. y Frohne, M. 1976. Crystalline leucine aminopeptidase from lens (alpha-aminoacid-peptide hidrolase; EC 3.411.1). *Methods in Enzymology*, 45:504-520.
- Hermansson, A.M. 1986. Water and fat holding. En *Functional Properties of Food Macromolecules*. Editores Mitchell, J.R. y Ledward, D.A. Elsevier Applied Science Publishers. Londres. pp. 273-314.
- Hernández, M. 1991. Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrótrofas y su efecto en la leche y productos lácteos *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 31(1):1-18.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T., Marine-Font, A. y Vidal-Carou, M.C. 1997. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:2098–2102.
- Herrera-Mendez, C.H., Becila, S., Boudjellal, A. y Ouali, A. 2006. Meat ageing: Reconsideration of the current concept. A review. *Trends in Food Science and Technology*, 17(8):394-405.
- Hierro, E., De la Hoz, L y Ordoñez., J.A. 1999. Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47:1156-1161.
- Hobbs, G. 1991. Fish: Microbiological spoilage and safety. *Food Science and Technology Today*, 5:166-173.
- Hobbs, G. y Hodgkiss, W. 1982. The bacteriology of fish handling and processing. En: *Developments in Food Microbiology*, Volumen I. p. 71-117.
- Hoffmayer, E.R., Parsons, G.R. y Horton, J. 2006. Seasonal and interannual variation in the energetic condition of adult male Atlantic sharpnose shark *Rhizoprionodon terraenovae* in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Fish Biology*, 68(2):645-653.
- Hood, D.E. y Mead, G.C. 1993. Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry. En: *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food*. Blackie Academic and Professional, Glasgow. pp. 269-298.
- Hopwood, D. 1969. Fixatives and fixation: a review. *Histochemical Journal* 1: 323-360.

- Hotchkiss, J.H. 1988. Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres. *Food Technology*, 42(9):55-64.
- Huff, E. J. Parrish, Jr. F.C. y Robson, R.M. 1991. The effects of sex, animal age and postmortem aging time on selected characteristics of bovine longissimus muscle. *Proceedings of the 44th Annual Reciprocal Meat Conference*.
- Hughes, M.C., Healy, A., McSweeney, P.L.H. y O'Neill, E.E. 2000. Proteolytic specificity of cathepsin D on bovine F-actin. *Meat Science*, 56(2): 165-172.
- Huidobro, A. 1990. Modificaciones de las propiedades funcionales del músculo de pescado de especies infrautilizadas conservadas en congelación. Tesis doctoral, Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Huidobro, A. y Tejada, M. 1993. Emulsifying capacity of fish mince from several species during frozen storage. *Journal of Food Science*, 61:333-339.
- Hultin, H.O. 1993 Características del tejido muscular. En: *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza. pp. 815-881.
- Hundgerford, J.M 1993. Seafood toxins and seafood products. *Journal of the AOAC International*, 76:120-130.
- Hurley, W.C., Gardner, F.A y Van der Zant, W.C. 1963. Some characteristics of a proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Food Science*, 28:47-54.
- Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO. Fisheries Technical Paper 348. FAO, Roma, Italia. P 68-92
- Hwang, D.F., Chang, S.H., Shiua, C.Y. y Chai, T.J. 1997. High-Performance liquid chromatographic of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatographic, B*, 693:23-30.
- Ilian, M.M. Bickerstaffe, R. y Greaser, M.L.2003. Postmortem changes in myofibrillar bound calpain 3 revealed by immunofluorescence microscopy. *Meat Science*, 66:231-240
- Ishioroshi, M., Samejima, K. y Yasui, T. 1979. Heat-Induced gelation of myosin:Factors of pH and salt concentrations. *Journal of Food Science*, 44(5):1280-1284.
- Izquierdo, P., Allara, M., Torres, G., Sanchez, M., Peña, G., Sangronis, M. 2004. Aminas biógenas y crecimiento bacteriano en carne de hamburguesas. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad del Zulia, Venezuela*. 14(1):7-12.
- Jaarsveld,F.P., Naudé, R. J. y Oelofsen, W. 1997. The effects of Ca Ions, EGTA and Storage Time on Myofibrillar Protein Degradation, Levels of Ca²⁺-dependent Proteases and Cathepsins B, H, L, y D of Ostrich Skeletal Muscle. *Meat Science*, 45:517-529.
- Jabbar, H. y Joishy K.N. 1999. Rapid Detection of *Pseudomonas* in seafood using protease indicator. *Journal of Food Science*, 64(3):547-549.
- James, C., Thornton, J. A., Ketteringham, L y James, S. J. 2000. Effect of steam condensation, hot water or chlorinated hot water immersion on bacterial numbers and quality of lamb carcasses. *Journal Food Engineering*, 43: 219-225.
- James, S.C. y James, C. 2002. Microbiology of refrigerated meat. En: *Meat Refrigeration*. CRC Press, Boca Raton. pp. 3-19.

- Jay, J.M. 2000. Taxonomy, role and significance of microorganisms in foods. En: Modern food microbiology. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland. pp13-34
- Jiang, S.T. 2000 Enzymes and Their Effects on Seafood Texture En: Seafoods Enzymes, Editor, Haard N.F. y Simpson. Marcel Dekker., Nueva York. B.K. pp. 411-450.
- Jiang, S.T., Nei, P.F., Chen, H.C. y Wang, J.H. 1992. Comparative Study on the Cathepsin D from Banded Shrimp (*Penaeus japonicus*) and Grass Shrimp (*Penaeus monodon*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40:961-966.
- Jiang, S.T., Lee, J.J. y Chen H.C. 1999. Proteolysis of actomyosin by cathepsins B.L, L-like, and X from mackerel (*Scomber australasicus*). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44:769-773.
- Jiang, S.T., Tsao, C.Y., Wang, Y.T. y Chen, C.S. 1990 Purification and properties from milkfish muscle (*Chanos chanos*). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 38:1458-1463.
- Jiang, S.T., Wang, J.H., y Chen, C.S. 1991. Purification and some properties of calpain II from Tilapia muscle (*Tilapia nilotica x Tilapia aurea*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 237-241.
- Jiang, S.T. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. Proceedings of the National Science Council, ROC Part B. Life Science 22(3)97-107.
- Jiménez-Colmenero, F. y Borderias, A.J. 1983. A study of the effects of frozen storage of certain functional properties of meat and fish protein. Journal of Food Technology, 18:731-737.
- Jiménez-Colmenero, F. y García-Matamoros, E. 1981. Effects of washing on the properties of mechanically deboned meat. Proceedings of the 27th European Meeting of meat research workers. O. Pränld, Viena. pp 351-354
- Johnston, I.A., Frearson, N y Goldspink, G. 1973. Effects of environmental temperature on the properties of myofibrillar adenosine triphosphate from various species of fish. Biochemical Journal, 133:735-738.
- Johnston, I.A., Walesky, N.H., Davison, W y Goldspink, G. 1975. Temperature adaption in myosin of antartic fish. Nature, 254:74-75.
- Jones, K.W. 1984 Protein-lipid interaction in processed meats. Proceedings of the 37th Annual Reciprocal Meat Conference, 37:52-57.
- Jones, K.W. y Mandingo, R.W. 1982. Effect of chopping temperature on the microstructure of meat emulsions. Journal of Food Science, 47(6):1930-1935.
- Jung, S., Ghoul, M. y de Lamballerie-Anton, M. 2000. Changes in lysosomal enzyme activities and shear values of high pressure treated meat during ageing. Meat Science, 56(3): 239-246.
- Kalischewski, K y Schurgerl, K. 1979. Investigation of protein foams obtained by bubbling. Colloid Polymer Science, 257:1099-1110.
- Kanawa, R. Ji, R.J. y Takahashi K. 2002. Inactivity of calpain throughout postmortem aging of meat, Journal of Food Science, 67:635-638.
- Kato, A., Takahashi, A. Matsudomi, N. y Kobahashi, K. 1983. Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. Journal of Food Science, 48:62-65.

- Kato., A., Fujishige, T., Matsudomi, N y Kobayashi K. 1985. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *Journal of Food Science*, 48:62-65.
- Kavalnov, A y Wennerstrom, H. 1996. Macroemulsion stability: The oriented edge theory revisited. *Lagmuir*, 12(2):276-292.
- Kawasaki, H., Emori, Y. y Suzuki, K. 1993. Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain: effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2):467-472.
- Kiernan, A. J. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*, 1:8-12.
- King, E. O., Ward, M. K. y Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44 (2): 301-307.
- Kinsella, J.E y Whitehead, D.M. 1989. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33:343-438.
- Kinsella, J.E.y Pearce K.N. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation to a turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 26(3):716-723.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in food: A survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7: 219-280.
- Kinsella, J.E. 1984. Milk protein: physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 21:197- 262.
- Kirsh, R.H., Berry, F.E., Baldwin, C.L. y Foster, E.M. 1952. The bacteriology of refrigerated ground beef. *Food Research*, 14:495-503.
- Kishonti, E. y Sjöström, G. 1970. Influence of heat resistant lipases in psychotropic bacteria on product quality. *Proceedings of the 18th International Dairy Congress*. Ramsey Wade, Melbourne, Australia. p. 501.
- Klemaszewski, J., Haque, Z. y Kinsella, J.E.1989. An electronic imaging system for determining the droplet size and dynamic breakdown of protein stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 54:440-445.
- Kletter, P.G. 1995. Meat and meat products. Measuring texture and consistency with testing machines. *Fleischwirtsch International*, (2):36-39.
- Ko, W.C., Hwang, J.S., Jao, C.L., y Hsu, K.C. 2004. Denaturation of tilapia myosin fragments by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 69(8):604-607.
- Kobayashi, M., Iseki, K., Saitoh, H. y Miyazaki, K. 1992. Uptake characteristics of polyamines into rat intestinal brushborder membrane. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1105: 177-183.
- Koohmaraie, M. 1992. Role of the Neutral Proteinases in Postmortem Muscle Protein Degradation and Meat tenderness. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 45:63-71.
- Koohmaraie, M., Whipple, G. y Crouse, J.D. 1990. Acceleration of postmortem tenderization in lamb and Brahman-cross beef carcasses through infusion of calcium chloride. *Journal of Animal Science*, 68:1278-1283.

- Koohmaraie, M.; Seideman, S. C., Schollmeyer, J. E., Dutson, T. R. y Babiker, A. S. 1988. Factors associated with the tenderness of three bovine muscles. *Journal of Food Science*, 53:407-410
- Koolmes, P.A., Moerman, P.C. y Zijderveld, M.H.G. 1989. Image analysis of the fat dispersion in a comminuted meat system. *Food structure*, 8:81-86.
- Kristinsson, H.G. y Rasco A.B. 2000. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle protein hydrolysed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48:657-666
- Krzymien, M. E., Elias, L. 1990. Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine headspece analysis. *Journal of Food Science*, 55: 1228-1232.
- Kumamoto T., Kleese W.C., Cong J.Y., Goll D.E., Pierce P.R. et Allen R.E. 1992. Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anatomical Record*, 232 (1), 60-77.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of General Physiology*, 30(4): 291-310.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage t4. *Nature*, 227:680-685.
- Lansdell, J. L., Miller, M. F., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M. y Ramsey, C. B. 1995. Postmortem injection of calcium choride effects on beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 73:1735-1740.
- Latreille, B y Paquin, P. 1990, Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. *Journal of Food Science*, 55: 1666-1668, 1672.
- Lawrie, R.A. 1998. *Meat Science*. Woodhead Publisng Limited. Cambrigde, Inglaterra. pp.258-269.
- Lea, C. H., Parr, J. L y Jackson, F.H. 1969. Chemical and organoleptic changes in poultry meat resulting from the growth of psychrophilic spoilage bacteria at 1°C. Glutamine, glutathione, tyrosine, ammonia, lactic acid, creatine, carbohydrate, heam pigment and hydrogen sulphide. *British Poultry Science*, 10:229-238.
- Leclerc, H. Mossel, D.A.A, Edberg, S.C. y Struijk, C.B. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group. *Annual Review of Microbiology*, 55:201-234.
- Lee, C. H. y Rha, C. K. 1979. Rheological properties of protein in solution. En *Food Texture and Rheology*, Ed. Sherman, P. Academic Press, Londres. pp. 245-263.
- Lee, C.M. 1985. Microstructure of meat emulsions in relation to fat stabilization. *Food Microstructure*, 4:63-72.
- Lee, S., Norman, J.M., Gunasekaran, S., Van-Laack, R.L.J.M., Kim, B.C. y Kauffman, R.G. 2000. Use of electrical conductivity to predict water-holding capacity in post-rigor pork. *Meat Science*, 55(4): 385-389.
- Leinmuller, R. y Christophersen, J. 1982. Studies on a heat-resistant proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*. *Milchwissenschaft*, 37:270-272.

-
- Liboff, M., Goff, H.D., Haque, Z., Jordan, W.K. y Kinsella, J.E 1988. Changes in the ultrastructure of emulsions as a result of electron microscopy preparation procedures. *Food Microstructure*, 7:67-74.
- Li-Chan, E., Nakai, S., & Wood, D. F. 1985. Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. *Journal of Food Science*, 50(4): 1034–1040.
- Lins, L, Thomas, A. y Brasseur, R. 2003. Analysis of accesible surface of residues in proteins *Protein Science*, 12(7):1406-1417.
- Liston, J. 1992. Bacterial spoilage of seafood. En: *Quality Assurance in the Fish Industry*, Editores, Huss, H.H., Jakobsen, M. y Liston, J. Elsevier Publishers, Amsterdam. pp. 93-105.
- Liu, M. N., Foegeding, E. A., Wang, S. F., Smith, D. M., & Davidian, M. 1996. Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(6):1435–1440.
- Love, R.M. y Elerian, M.K. 1964. Protein denaturation on frozen fish. VIII: The temperature of maximum denaturation in cod. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15: 805-809.
- Luyten, H, Jonkman, M., Kloek, W. y van Vliet, T. 1993. Creaming behaviour of dispersed particles in dilute xanthan solutions. En: *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. Editores Dickinson E. y Walstra P. Royal Society, Cambrige, Inglaterra. pp. 224-234
- Luyten, H. Vereijken, J. y Buecking, M. 2004. Using proteins as additives in foods: an introduction. En: *Proteins in Food Processing*, Editor, R.Y. Yada. CRC Press, Boca Raton. pp 421-441.
- Macdonald, J.K y Barret, A.J. 1986 *Mammalian Proteases*. Volumen 2. Academic Press, Nueva York. pp 357.
- Mackellar, R.C. 1982. Factors influencing the production of cellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Applied Bacteriology*, 53:305-316.
- Mahmoud, M.L. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, 58(10): 89-95.
- Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kostka V. y Baudys, M., 1989. Primary structure of cathepsins D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soy trypsin inhibitor family. *FEBS Letters*, 251:94-98.
- Margesin, R. y Schinner, F. 1992. A comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 385:209-225.
- Maruyhama, K., Miurakami, F. y Ohashi, K. 1977. Connectin and elastic protein of muscle. Characterization and function. *Biochemical Journal*, 82:3 17-337.
- Masakuyi, M., Whiting, A., Taylor, M.A.J., Maciewicz, R.A., y Etherington, D.J. 1987. Degradation of myofibrils of rabbit, chicken , and bovine for cathepsin L. *Meat Science*, 21:81-87.

- Matsumiya, M., Mochizuki, A. y Otake S. 1989. Purification and characterization of cathepsin B from ordinary muscle of common mackerel, *Scomber japonicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55:2185-2190.
- McClements, D.J. 1999a Emulsion Formation. En: Food emulsions: Principles, Practice and Techniques. CRC Press, Nueva York. pp. 161-184
- McClements, D.J. 1999b Emulsion Stability. En: Food emulsions: Principles, Practice and Techniques. CRC Press, Nueva York. 185-233.
- McGrath, M.E 1999. The lisosomal cysteine proteases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28:181-204.
- Melendo, J.A. Beltrán, J.A. y Roncales P. 2001 Preservation of the proteolytic activity of a bovine spleen lisosomal-enriched extract using various freezing conditions. *Enzyme and microbial technology*, 28:453-459
- Méndez-Medina, D., Becerril, H.M., Rubio, M.S. y Delgado, S.E.J. 2002 Características de la canal del cerdo pelón mexicano, procedente de Mizantla, Veracruz, México. *Veterinaria México*, 33(1):27-37.
- Meyer, N.L., Fischer, E.H. y Krebs, E.G. 1964. Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca^{2+} . *Biochemistry*, 3:1033-1039.
- Miller, A., Scanlan, A.R., Lee, J.S., Libbey, M.L. y Morgan, E.M. 1973. Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Applied Microbiology*, 25(2):257-261
- Milliere, J. B., y Veillet-Poncet, L. 1979. Caractérisation des systèmes enzymatiques protéolytiques de deux souches psychrotrophes isolées de laits crus réfrigérés. 59:269-298.
- Minihan, D., Whyte, P., O'Mahoney, M. y Collins, J.D. 2003. The effect of commercial steam pasteurization on the levels of Enterobacteriaceae and Escherichia coli on naturally contaminated beef carcasses. *Journal of Veterinary Medicine*, B 50: 352-356.
- Minocha, S.C., Minocha, R. y Rabie, C.A. 1990. High performance liquid chromatographic method for the determination of dansyl polyamines. *Journal of Chromatography*, A. 511:177-183.
- Minor-Pérez, H, Ponce-Alquicira, E. Macias-Bravo, I. y Guerrero-Legarreta, I. 2004. Changes in fatty acids and microbial populations of pork inoculated with teo biopreservative strains. *Meat Science*, 66:793-800.
- Minor-Pérez, H. 1998. Cambios en parámetros fisicoquímicos relacionados con la calidad de la carne de cerdo sometida a fermentación láctica como método de bioconservación. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F, México.
- Misima, T., Yokoyama, T., Yano, K. y Tsuchimoto, M. 1990. The influence of rearing water temperatura on the properties of Ca^{2+} and Mg^{2+} -ATPase activity on carp myofibril. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 26:477-487.
- Mitchell, G.E., Ewings, K.N. y Bartley, J.P. 1986. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophics bacteria. *Journal of Dairy Research*, 53:97-115.

- Mitsuhashi, T., Kasai, M. y Hatae, K. 2002. Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin in fish meat by electrophoresis in 3-5 gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide slab gels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50 (26), 7499 - 7503.
- Mittal., G.S. 2005 Meat in emulsion type sausages. An overview. *Journal of Food Agriculture and Environmental Engineering*, 3(2):101-108.
- Mittal., G.S., C.Y. Wang y W. R Usborne 1987. Smokehouse process conditions for meat emulsions cooking. *Journal of Food Science*, 52:1140-1146, 1154.
- Moldoveanu, T., Hosfield, C.M., Jia, Z., Elce, J.S. y Davies, P.L. 2001. Ca²⁺-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545:245-254.
- Molin, G. y Ternström, A. 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *Journal General of Microbiology*, 128(6):1249–1264.
- Morgan, J.B., Wheller, T. L., Koohmaraie, M, Savell, J.W. y Crouse J.B 1993. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. *Journal Animal Science*, 71:1471-1476.
- Morr, C.V., German, B. y Kinsella, J.E. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50:1715-1718.
- Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M. y O'Neill, E.M. 1987. Functional properties of muscle proteins. En: *Developments in Food Proteins*. B.J.F. Hundson (Ed.). Elsevier Applied Science Publishers, Londres.pp-195-256.
- Mourtzinos, I. y Kiosseoglou, V. 2005. Protein interactions in comminuted meat gels containing emulsified corn oil. *Food Chemistry*, 90:699-704.
- Muramoto, M., Yamamoto, Y. y Seki, N. 1988. Comparison of calpain susceptibility of various fish myosins in relation to their thermal stabilities. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54:917-923.
- Muthukumarasamy, P., Han, J. H. y Holley, R. A. 2003. Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. *Journal of Food Protection*, 66: 2038-2044.
- Myhara, R.M. y Skura, B.J. 1989. Growth conditions affecting proteolytic enzyme and extracellular vesicle production by *Pseudomonas fragi* ATCC 4973. *Journal of Food Science*, 54(3)686-690,694.
- Naguib, K., Ayesh, A., M. y Shalaby, A. R. 1995. Studies on the determination of biogenic amines in foods 1. Development of a TLC method for the determination of 8 biogenic amines in fish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43:134-139.
- Naidu, A. S. 2000. Activated lactoferrin: A new approach to food safety. *Food Technology*, 56: 40-45.
- Nakai, S. y Li-Chan, E. 1988. *Hydrophobic Interactions in Food System*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL pp 23-41

- Nassos, P.S., King, A.D. y Stafford, A.E. 1983. Relationship between lactic acid concentration and bacterial spoilage in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4):894-900.
- Nave, R., Furst, D.O., Weber, K. 1989. Visualization of the isolated titin molecules: a single globular head as the anchoring domain?. *Journal of Cell Biology*, 109: 2177-2188.
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). 1992. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, Orlando.
- Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R. y Haisman, D. 1992. Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-gluconolactone. En: 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, Francia. pp. 1095-1098.
- Ngapo, T.M., Babare, I.H., Reynolds, J., y Mawson, R.F. 1999a. A preliminary investigation of the effects of frozen storage on samples of pork. *Meat Science*, 53(3):169-177.
- Ngapo, T.M., Babare, I.H., Reynolds, J., y Mawson, R.F. 1999b. Freezing rate and frozen storage effects on the ultrastructure of samples of pork. *Meat Science*, 53(3):159-168.
- Nottingham, P. M. 1982. Microbiology of carcass meats, En: *Meat Microbiology*, Editor, Brown, M.H. London, Applied Science, 13-65.
- Novikoff, B.A. y Holtzman, E. 1978. Estructura y dinámica celular. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. Edición 2^a. pp 132-146.
- Nychas, G.J.E., Drosinos, E.H. y Board, R.G. 1998. Chemical changes in stored meat. En: *The Microbiology of Meat and Poultry*. Editores: Davies A., y Board, R.G. Blackie Academic & Professional. pp.288-326.
- O'Neill, E., Morrissey, P.A. y Mulvihill, D.M. 1990. The surface-active properties of muscle proteins. *Food Chemistry*, 35:1-12.
- O'Shea, J.M., Robson, R.M, Hartzler, M.K., Huiatt, T.W., Rathbun, W.E y Stromer, M.H. 1981. Purification of desmin from adult mammalian skeletal muscle. *Journal of Biochemistry*, 195:345-356.
- Ockerman, H.W., Cahill, V. R., Weiser, H.H., Dacis, C. E., y Siefker, J.R. 1969. Comparison of sterile and inoculated beef tissue, *Journal of Food Science*, 34:93-99.
- Olson, R.E. 1987. Marine parasites of public health importance. En: *Seafood Quality Determination*. Kramer, D.E y Liston J. Elsevier Publishers, Amsterdam. pp 339-355.
- Ordoñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M. y Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39: 329-367.
- Ouali A. 1992. Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie*. 74: 251-265.
- Owusu-Apenten, R.K. 2004. Testing protein functionality. En: *Proteins in Food Processing*. Editor, R.Y. Yada . CRC Press, Boca Raton. pp 217-244.
- Oyarzabal, O. 2005. Reduction of *Campylobacter* spp. by commercial antimicrobials applied during the processing of broiler chickens: a review from the United States perspective. *Journal of Food Protection*, 68: 1752-1760.

- Paleologos, E. K.; Savvaidis, I. N.; Kontominas, M. G. 2004. Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiol*, 21: 549-557.
- Palka, K., y Daun, H. 1999. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine *M.semitendinosus* during heating. *Meat Science*, 52 (3): 237-243.
- Parr, T., Sensky, G.P., Scothorn, G.P., Bardsley, R.G., Buttery, P.J, Wood y Warnup, C. 1999. Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 77:661-668.
- Pascual-Anderson, M. R. (2000). Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas, pp 441. Ed. Díaz de Santos, S. A., Madrid.
- Patel, T. R., Jackman, D.M, Williams, G.J y Bartlett, F.M. 1986. Physicochemical properties of heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonads. *Journal of Food Protection*, 49:183-188.
- Pearce, N.K. y Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26:716-723.
- Pearson, A.M. y Young, R.B. 1989. Muscle and meat biochemistry. Academic Press, Inc., USA
- Pérez-Alvarez, J.A. 1996. Contribución al estudio objetivo del color en productos cárnicos crudos-curados. Tesis Doctoral. Valencia, España., Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politecnica de Valencia.
- Pérez-Casas, L., Rubio, M.S., Méndez, M.D., Feldman, K.J. e Iturbide, C.F.A. 1999 Evaluación química y sensorial de morcón de cerdo pelón mexicano y cerdo mejorado. *Veterinaria México*, 30(1):41-48.
- Pérez-Chabela, M.L., Escalona, H. y Guerrero, I. 1998. Effect of Calcium Chloride Marination on Calpain and Quality Characteristics of Meat from Chicken, Horse, Cattle and Rabbit. *Meat Science*, 48:125-134.
- Peterson, A.C. y Gunderson, M.F. 1960. Some characteristics of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbiology*, 8:98-104
- Pilosof, A. 2000. Solubilidad. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Editores: Pilosof, M.R..A.y Bartholomai, B. G. EUDEBA.Argentina pp.91-40.
- Pohlman, F. W., Stivarius, M. R., McElyea, K. S. y Waldroup, A. L. 2002. Reduction of *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, coliforms, aerobic bacteria, and improvement of ground beef color using trisodium phosphate or cetylpyridinium chloride before grinding. *Meat Science*, 60: 349- 356.
- Polidori, P., Trabalza-Marinucci, M., Fantuz, F. y Polifuri, F. 2001. Post mortem proteolysis and tenderization of beef muscle through infusion of calcium chloride. *Animal Research*, 50:223–226.
- Poon, S, Clarke, A.E. y Schultz, C.J. 2001. Effect of denaturants on the emulsifying activity of proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49:281-286.
- Pour-EI, A. 1981. Protein functionality: classification, definition and methodology. En: Protein functionality. Cherry (Ed.). ACS Symposium Series 147, Nueva York. pp. 1-20.

- Price, J.F. y Schweigert, B.S. 1981. The Science of meat and meats products. W.H. Freeman and Company. San Francisco, E.U. pp 11-77.
- Putter, J.D. y Gergely, J. 1975. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 250 (12): 4628-4633.
- Quevedo, R., Lopez, G.C., Aguilera, J.M. y Cadoche, L. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using image texture analysis. *Journal of Food Engineering*, 53:361-371.
- Rajmohan, S. Dodd, C.E.R. y Waites, W.M. 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 93:205-213.
- Ramírez, A. J., Acuff, G. R., Lucia, L. M. y Savell, J. W. 2001. Lactic acid and trisodium phosphate treatment of lamb breast to reduce bacterial contamination. *Journal of Food Protection*, 64: 1439-1441.
- Ramírez, A. J., García-Carreño, O.G. Morales, y Sánchez. A.2002. Inhibition of Modori-Associated proteinases by legume seed extracts in surimi production, 67(2):578-581.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P y Barret, A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Journal Biochemical*, 378, 705–716
- Reeck, G.R., K.J. Kramer, J.E. Baker, M.R. Kanost, J.A. Fabrick, and C.A. Behnke. 1997. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In N. Carozzi, and M. Koziel (eds.), en el libro *Advances in Insect Control: the Role of Transgenic Plants to Insects*. London: Taylor & Francis, pp. 157-183.
- Regenstein, J.M, Schlosser, M.A., Samson, A., y Fey, M. 1982. Chemical changes of trimethylamine oxide during fresh and frozen storage of fish. En: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. Editores. Martin, E.E., Flick, G.J., Hebard, C.E., y Ward, D.R, CT. AVI Publ. Westport, Connecticut .pp. 137–148.
- Regenstein, J.M., 1988. Meat batters: Why it is not an emulsion. 41 Proceedings of the Annual Reciprocal Meat Conference, pp. 40-43
- Rha, C. y Pradipasena, P. 1986. Viscosity of proteins En: *Functional Properties of Food Macromolecules*. Editores Mitchell, J.R. y Ledward D.A. Elsevier Applied Science Publishers Londres, pp 79-120.
- Rice, E.W. y Johnson, C.H. 1991 Cholera in Peru. *The Lancet*, 338 (8764):455-455
- Rico, E, Toldra, F. y Flores, J. 1991. Assay of cathepsin D activity in Fresh pork muscle and dry-cured ham. *Meat Science*, 29:287-293
- Robins, M.M., Watson, A.D. y Wilde, P.J. 2002. Emulsions: creaming and rheology. *Current Opinion in Colloid Interface Science*, 7:419-425.
- Robson R.M. y Huiatt, T.W. 1983. Roles of the cytoskeletal proteins desmin, titin and nebulin in muscle. *Reciprocal meat Conference Proceedings*, 36: 116-124.
- Rodríguez de la Cruz, M.C., Castillo-Géniz, J.L. y Márquez-Farías, J.F. 1996. Evaluación de la Pesquería de Tiburón del Golfo de México. Dirección General de Análisis de Pesquerías. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca. México D.F., México.

- Roig-Sagués, A.X., Hernandez-Herrero, M. Rodríguez-Jeréz, J.J., Lopez-Sabater, L.I. y Mora-Ventura, M.T. 1997. Histidina descaboxylase activity of *Enterobacter cloacae* S15/19 during the production of ripened sausages and its influence on the formation of cadaverine. *Journal of Food protection*, 60(4):430-432.
- Roncalés, P., Geesink, G.H., van Laack R..L.J.M., Jaime, I., Beltrán, J.A., Barnier, V.M.H. y Smulders, F. J. M. 1995. Meat tenderization: enzymatic mechanism. En: Expression of tissue proteinases of protein degradation as related to meat quality. Editores Ouali, A.; Demeyer D.I. y Smulder, F.J.M. pp-47-67.
- Rosenthal, A.J. 1999. Relation between instrumental and sensory measures of food texture. En *Food Texture, Measurement and Perception*. Editor. Rosenthal, A.J. Aspen Publishers. Gaithersburg, Maryland. pp-1-17
- Rossi, S., Lee, C., Ellis, P.C. y Pivarnik. L.E. 2002. Biogenic amines formation in big eye tuna steaks and whole skipjack tuna. *Journal of Food Science*, 67(6)-2056-2060.
- Roudot, A.C. 2003. Reología y analisis de la textura de los alimentos. *Acribia*, Zaragoza. pp.163-172.
- Ruiz-Campillas, C y Jimenez-Colmenero, J.F. 2004. Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8): 489-599.
- Ruiz-Campillas, C. y Moral, A. 2001. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, 66(7):1030-1032.
- Rustad, T. 2003. Utilization of marine by-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(4):458-463.
- Sadowska, M., Naczka, M., Sikorsky, Z. y Ziminska, H. 1981. The use of fish protein preparations in meat sausages. *Proc. 27th European Congress of Meat Research Workers*. Viena, Austria pp 449-452.
- Saido T.C., Sorimachi H. et Suzuki K. 1994a. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *Journal Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8, 814-822.
- Saido, T. C., Nago, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Ito, H., Tsuchiya, T., Kawashima, S. y Suzuki, K. 1994b. Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation *FEBS Letters*, 346:263–267.
- Sancho, J. 2003. Los aminoácidos, el enlace peptídico y la estructura secundaria. En *Estructura de proteínas*. Editores: Gomez-Moreno, C. y Sancho, J Ariel Ciencia Barcelona, España. pp: 31-62.
- Sancho, R., Jaime, I., Beltran, A. J., y Roncales P. 1997. Degradation of Actin by Cathepsins in Beef Fibers Stored At 20°C. *Journal of Muscle Foods*, 8:137-146.
- Sano, T., Noguchi, S.F., Tsuchiya, T. y Matsumoto, J.J. 1986. Contribution of paramyosin to marine gel characteristics. *Journal of Food Science*, 51:946-950.
- Sano, T., Noguchi, S.F., Tsuchiya, T. y Matsumoto, J.J. 1989. Contribution of tropomyosin to fish gel characteristics. *Journal of Food Science*, 54:258-264.

- SAS, 1996. Programa de análisis estadístico v 6.12 Cary, N.C. SAS Institute Inc.
- Satterlee, L.D. 1975. Improving utilization of animal by-products for human foods. A review. *Journal of Animal Science*, 41(2):687-697.
- Scanga, J.A., Delmore, R.J.Jr., Ames, R.P., Belk, K. E., Tatum, J.D. y Smith, G.C. 2000. Patability of beef steaks marinated with solutions of calcium chloride, phosphate, and (or) beef-flavoring. *Meat Science*, 55 (4):397-401.
- Scanlan, R. 1995. Volatile nitrosamines in foods – an update. En: *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Elsevier Science B. V., pp: 685-704.
- Schmidtsdorff, W. 1995. Productos pesqueros. En: *Harina y aceite de pescado*. Editor Ruitter, A. Acribia., Zaragoza. pp 371-403.
- Schoebitz, R., De la Vega, J.A. y Tamayo, R. 1990. Calidad microbiológica y sensorial de la carne de vacuno envasada al vacío almacenada a diferentes temperaturas. *Fleischwirtschaft*, (2):31-36.
- Schut, J., 1976. Meat emulsions, En *Food Emulsions*, Ed, Friberg, S., Marcel Dekker, Nueva York. pp. 385-458.
- Scott-Blair, G. 1958. Rheology in food research. *Advances in Food Research*, 8:1-56.
- Seibel, B.A. y Walsh P.J. 2002. Trimethylamine accumulation in marine animals relationships to acylglycerol storage. *Journal of Experimental Biology* 306:297-306.
- Seideman M.C. 1986. Methods of expressing collagen characteristics and their relationship to meat tenderness and muscle fiber types. *Journal of Food Science*, 51:273-276.
- Seideman, S.C. y Koohmaraie, M. 1987. Factors associated with tenderness of selected beef muscles. *Meat Science*, 20:281–291.
- Seki, N. y Arai K. 1974. Gel filtration and electrophoresis of fish myofibrillar proteins in the presence of sodium dodecyl sulphate. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 40(11): 1187-1194.
- Seymour, T.A., Morrissey, M.T., Peters, M.Y. y An, H. 1994. Purification and characterization of Pacific whiting proteinases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42:2421-2427.
- Shalaby A.R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29:675–690.
- Sharma, A., Padwal-Desai, S. y Ninjoor, V. 1989. Intracellular hydrolases of *Aspergillus parasi* and *Aspergillus flavus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(2):464-471
- Shay, G.J., Egan, A.F., Writgh, M. y Rogers, P.J 1988. Cysteine metabolism in a isolated of *Lactobucillus sake* plasmid composition and cysteine transport. *FEMS Microbiology Reviews*, 56:183-188.
- Shimizu, M; Takahashi, T., Kaminogawa, S y Yamauchi K. 1983. Adsorption onto an oil surface and emulsifying properties of bovine a S1-casein in relation to its molecular structure. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31:1214-1228.
- SIAP, 2006a. Information Pecuaria: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_compec_principal.html

- SIAP, 2006b. Information Pesquera: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_compesq.html
- Siebert, G. 1962. Enzymes in marine fish muscle and their role in fish spoilage. En: Fish in Nutrition. Editores, Heen, E. y Kreuzer, R. Fishing News Books, Londres pp 80-81.
- Sikorski, Z.E, Gildberg, A. y Ruiter, A. 1995. Productos pesqueros. En: El pescado y los productos derivados de la pesca. Editor Ruiter, A. Acribia., Zaragoza. pp 335-369
- Sikorski, Z.E. y Kolakowska, A 2000. Endogenous Enzyme Activity and Seafood Quality: Influence of Chilling, Freezing, and Other Environmental Factors. En Seafoods Enzymes. Editores. Haard, N.F y Simpson, B. K Marcel Dekker., Nueva York. pp 451-487.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. y Pan, B.B. 1990. The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. En: Seafood Resources, Nutrition, Composition and Preservation. Editor, Sikorski, Z. E. CRC Press, Boca Raton. pp.22-54.
- Skaara, T. y Regenstein, J.M 1990. The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry and fish. Journal of Muscle Food, 1:269-291.
- Skiles, J.W., Gonnella, N.C. y Jeng, A.Y. 2004. The design structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. Current Medicinal Chemistry, 11:2911-2977.
- Skjervold, P., Fjaera, S., Ostby, P., and Einen, O., 2001. Live chilling and crowding in Atlantic salmon before slaughter. Aquaculture, 192:265-280.
- Smith, D.M. 1988. Meat proteins: Functional properties in comminuted meat products. Food Technology, 42(4):116-121.
- Smith, D.M. y Brekke, C.J. 1984. Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. Journal of Food Science, 49:1525-1528.
- Smith, G. C. 1996. Steam is the theme in the war on pathogens. Meat Processing: North American Edition 35: 32-34.
- Somoza, J.R., Zhan, H., Bowman, K.K., Yu, L., Mortara, K.D., Palmer, J.T., Clark, J.M., y McGrath, M.E. 2000. Crystal structure of human cathepsin. Biochemistry, 39:12543-12551.
- Sorimachi, H., Saido, T. y Suzuki, K. 1994. New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. FEBS Letters, 343:1-5.
- Sotelo, G.C. y Rehbein, H. 2000. OTMA- Degrading –Enzymes. En: Seafoods Enzymes, Editor, Haard N.F. y Simpson. Marcel Dekker., Nueva York. B.K pp 167-190.
- Soudan, F. 1965. La conservation para le froid des poissons, crustacés et mollusques. Baillière, J.B. et fils, Paris. pp 32-57.
- Stansby, M.E. 1962. Proximate composition of fish. En: Fish in Nutrition. E. Heen y R. Kreuzer (ed.). Fishing News Books, Londres. pp. 55-60.
- Staruszkiewicz, W.F. y Bond, J.F. 1981. Gas chromatographic determination of cadaverine, putrescine and histamine in foods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 64:584-591.

- Stratton, J.E., Hutkins, R.W. y Taylor, S.L. 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54:460-470.
- Sumner, S y Taylor, S.L. 1989. Detection method for histamine-producing, dairy-related bacteria using diamine oxidase and leucocrystal violet. *Journal of Food Protection*, 52:105-108.
- Surhen, G., 1992. *Producer Microorganisms En: Enzymes of psychrotrophs in raw foods*. Editor. Mackiller, R. Boca Raton., CRC Press. Florida pp.4-27
- Suzuki T. 1981. *Fish and krill proteins: Processing technology*. London: Applied Science Publishers. pp 32-34.
- Suzuki, K. and Ohno, S., 1990. Calcium activated neutral protease - Structure-function relationship and functional implications. *Cell Structure and Function*, 15:1-6.
- Swan, J.E. y Boles, J.A. 2006. Functionality of cow beef in coarse and fine ground model systems. *Meat Science*, 72(1):25-33.
- Swaigood, H.E. 1996. Characteristics of milk. En: *Food Chemistry*. Editor, Fennema, O. R., Marcel Dekker, Nueva York. pp 996-1038
- Swatland, H.J. 1996 Connective tissue distribution patterns in beef detected by ultraviolet fibre optics. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29:272-277.
- Swift, C.E., Lockett, C. y Fryar, A.J. 1961. Comminuted meat emulsions. The capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technology*, 15:468-472.
- Sybers, H.D y Ashraf, M 1973. Preparation of cardiac muscle for SEM. *Scanning Electron Microscopy*, 6:343-348.
- Tamim, N.M, Bennett, L.W. Shellem, T.A y Doerr, J.A. 2002. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in poultry carcasses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 250:5012-5015.
- Tan, F.C., Goll, D.E. y Otsuka, Y. 1988. Some properties of the millimolar Ca^{2+} -dependent proteinase from bovine cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 20:983-997.
- Tarrant, P.J.V., Pearson, A.M., Price, J.F. y Lechowich, R.V. 1971. Action of *Pseudomonas fragi* on the proteins of pig muscle. *Applied of Microbiology*, 22:224-228
- Taylor, R. G. y Goll, D. E. 1995. Enzyme localization during postmortem muscle tenderization. *Meat Science*, pp 347-358.
- Theno, D.M. y Schmidt, G.R., 1978. Microstructural comparison of three commercial frankfurters. *Journal of Food Science*, 43: 845-848
- Tokuyashu, K.T., Dutton, A.H., Geiger, B. y Singer, S.J. 1981. Ultrastructure of chicken cardiac muscle as studied by double immunolabeling in electron microscopy. *Proceedings National Academic Science. USA* 78:7619-7623.
- Toledo, R. 1973. Preparation and properties of low temperature extracted animal protein concentrates *Journal of Food Science*, 38:141-144.
- Torre, R. R. 1996. *Electrocinética En: Procesos de separación en la biotecnología* Instituto Politécnico Nacional, México. pp.3-18.

- Totosaus, S.A. 1996. Funcionalidad de extractos proteicos musculares de cabra y res. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México.
- Toyohara , H. y Shimizu, Y. Relation of the rigor mortis of fish body and the texture of the muscle. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1988; 54:1795-1798.
- Toyohara, H., y Makinodan, Y. 1989. Comparison of calpain I and calpain II from carp muscle. Comparative Biochemistry and Physiology, 92B(3), 577-581.
- Trout, G.R. 1988. Techniques for measuring water-binding capacity in muscle foods- A Review of methodology- Meat Science, 23:235-252.
- Tsai, R., Cassens, R.G. y Briskey, E.J. 1972. The emulsifying properties of purified muscle proteins. Journal of Food Science, 37:286-288.
- Tsuchiya, T., Suzuki, H. y Matsumoto J.J. 1977. Physicochemical and biochemical properties of squid actin. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 43:1233-1240.
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., y Paquin, P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 39(4):673-676.
- Turk, V., Turk, B., y Turk., D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. European Molecular Biology Organization Journal, 20(17):4629-4633.
- Twedt, R. 1989. *Vibrio parahaemolyticus*. En: Foodborne Bacterial pathogens. Editor. Doyle, M.P, Marcel Dekker, Nueva York. pp 543-568.
- Valin, C. 1995. Animal and muscle variability in tenderisation: Possible cause. Eceeamst, 435-442.
- Van Der Ven, C., Gruppen, H., Bont, D.B.A., Voragen, A. G. J. (2002) Correlations between biochemical characteristics and foam forming and stabilising ability of whey and casein hydrolysates. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50:2938-2946.
- Vidal-Carou, M.C., Izquierdo-Pulido, M.L., Martín-Morro, M. C. y Marine-Font C. 1990. Hystamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. Food Chemistry, 37:239-249.
- Vigoreaux, J.O. 1994. The muscle Z band: lessons on stress management. Journal of Muscle Research and Cell Motility, 15:237- 255.
- Visessanguan, W. y An H. 2001. Effects of proteolysis and mechanism of weakening in heat-induced gelation of fish myosin. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48:1024-1032.
- Visessanguan, W., Menino A.R, Kim, S.M y An H. 2001. Cathepsin L: A predominant heat activated proteinase in arrowtooth flounder muscle. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49: 2633-2640.
- Visessanguan, W., Ogawa, M., Nakai, S y An, H. 2000. Physicochemical changes and mechanism of heat-induced gelation of Arrowtooth flounder myosin. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48(1):1016-1023.

- Wagner, J.R. 2000. Propiedades superficiales. En: Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas. Editorial Ceudeba, Buenos Aires. pp 41-71.
- Wallner-Pendleton, E. A., Sumner, S. S., Froning, G. W. y Stetson, L. E. 1994. The use of ultraviolet radiation to reduce salmonella and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poultry Science*, 73: 1327-1333.
- Walls, E. W. 1960. The microanatomy of muscle. En: The structure and Function of Muscle. Editor, Bourne, G.H. Academic Press, Nueva York . Vol.1, pp 21.
- Walstra, P. 1996a. Dispersed Systems: Basic Considerations. En: Food Chemistry. Editor, Fennema, O. R., Marcel Dekker, Nueva York. pp 111-185.
- Walstra, P. 1996b. Emulsions stability. En: Encyclopedia of Emulsion Technology, Volumen 4. Editor, P. Becher, Marcel Dekker, Nueva York. pp 1-56.
- Wang, J.C. y Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of novel protein :Alfalfa leaf protein. *Journal of Food Science*, 41:286-292.
- Wang, J.H., Ma, W.C MA., Su J. C., Chen, C. S. y Jiang S. T. 1993. Comparison of the properties of m-calpain from tilapia and grass shrimp muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(9): 1379-138.
- Wang, K. y Williamson, C.L. 1980. Identification of an N2-line protein of striated muscle. *Proceedings National Academic Science, USA* 77:3254-3258.
- Wang, K., McClure, J. y Tu, A. 1979. Titin: Major Myofibrillar Components of triated Muscle. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76(8): 3698-3702.
- Waniska, R.D., Shetty, J.K. y J.E. Kinsella. 1981. Protein-stabilized Emulsions: Effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 29(4):826-831.
- Warner, K.F. 1928. Progress report of the mechanical tenderness of meat. *Proceedings of the American Society of Animal Production*, 21:114
- Webb, E.C. 1993. Enzyme Nomenclature: A Personal Retrospective.. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7:1193-1194
- Wheeler, T.L. y Koohmaraie, M. 1991. A modified procedure for simultaneous extraction and subsequent assay of calcium-dependent and lisosomal protease systems from a skeletal muscle biopsy. *Journal of Animal Science*, 72:1232-1238.
- Wheeler, T.L. y Koohmaraie, M. 1994. Prerigor and post rigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 72:1232-1238.
- Wilde, P., Mackie, A., Hundsband, F., Gunning, P y Morris, V. 2004. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloids and Interface Science*, 108-109:63-71.
- Wilding. P., Lillford, P.J y Regenstein, J.M 1984. Functional properties of protein in foods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 34B:182-189.
- Willstätter, R y Bamann, E. 1929 Uber die proteasen der magenschleimhaut. *HoppeSeyler's Z. Physiol. Chem*, 180:127-143.

- Wright, D.J. y Wilding, P. 1984. Differential scanning calorimetric study of muscle and its constituent proteins: myosin and its fragments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(3):357-372
- Xiong, Y.L. 2004. Muscle Proteins. En: *Proteins in food processing*. Editor, R.Y. Yada. CRC Press, Boca Raton. pp. 100-122.
- Xiong, Y.L y Kenney P.B 1999. Functionality of proteins in meat products. *Proceedings of the 52nd Annual Reciprocal Meat Conference*. pp. 67-69
- Yamaguchi, T., Yashita, Y., Takeda, I. y Kiso, H. 1983. Enzymes in green asparagus kiwi fruit and mait: Occurrence and partial characterization, *Agricultural and Biological Chemistry* 46(8): 1983-1986.
- Yamashita, M. y Konagaya, S. 1990. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippo Suisan Gakkaishi*, 26:1271-1277.
- Yamashita, M. y Konagaya, S. 1991. Immunohistochemical localization of cathepsin B and L in the White muscle chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in spawning migration: probable participation of phagocytes rich in cathepsins in extensive muscle softening of mature salmon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39:1402-1406
- Yamauchi, K., Shimizu, M. y Kamika, T. 1980. Emulsifying properties of whey protein. *Journal of Food Science*. 45(5): 1237-1242.
- Yan, L., Langlois, B.E. y O'leary, J. 1985. Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs. *Journal of Dairy Science*, 68:1323-1336.
- Yongsawatdigul, J., Park, J.W, Virulhakul, P y Viratchakul S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. *Journal of Food Science*, 65(1) 129-133
- Yongsawatdigul, J., Park, J.W. y Kolbe E. 1997. Degradation kinetics of myosin heavy chain of Pacific whiting surimi. *Journal of Food Science*, 62(4):724-728.
- Yongsawatdigul, J.; Choi, Y. J.; Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Journal of Food Science*, 69 (4): 312-319.
- Yu, L.P. y Lee, Y.B. 1996 Effects of postmortem pH and temperature on Bovine muscle structure and meta tenderness. *Journal of Food Science*, 51 (3): 774-780
- Zeece, J.A., Simard, R.E. y L'Heureux, L. 1983. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. *Journal of Food Protection*, 46:1044-1049.
- Zhao, X., Kobayashi, T., Malak, H., Gryczynky, I., Lakowicz, L., Wade, R. y Collins, J. H. 1995. Calcium-induced troponin flexibility revealed by distance distribution measurement between engineered sites. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 15507-15514.

10. Anexos

Anexo I. Determinación de proteína por el método de biuret (Gornall y col., 1949)

Reactivos:

- 1.5 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 6 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 500 ml de agua destilada.

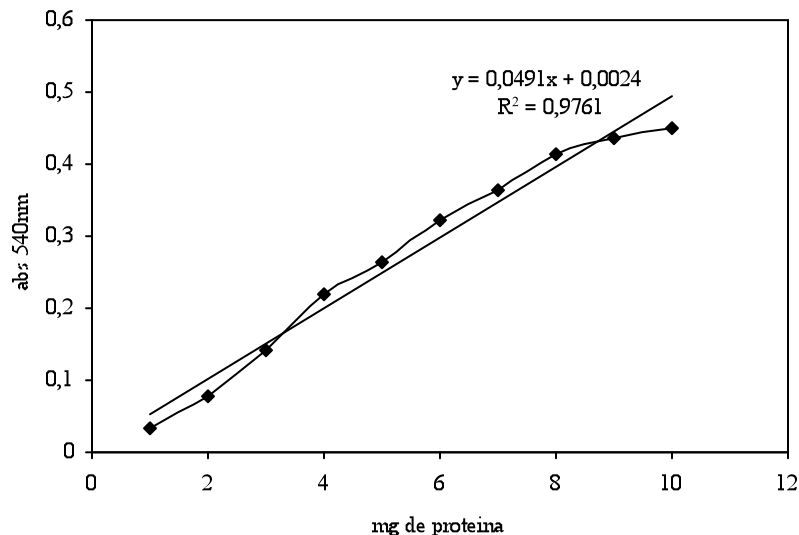
- 300 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %.

Se afora 1 000 mL con agua destilada, almacenándose en frasco ámbar.

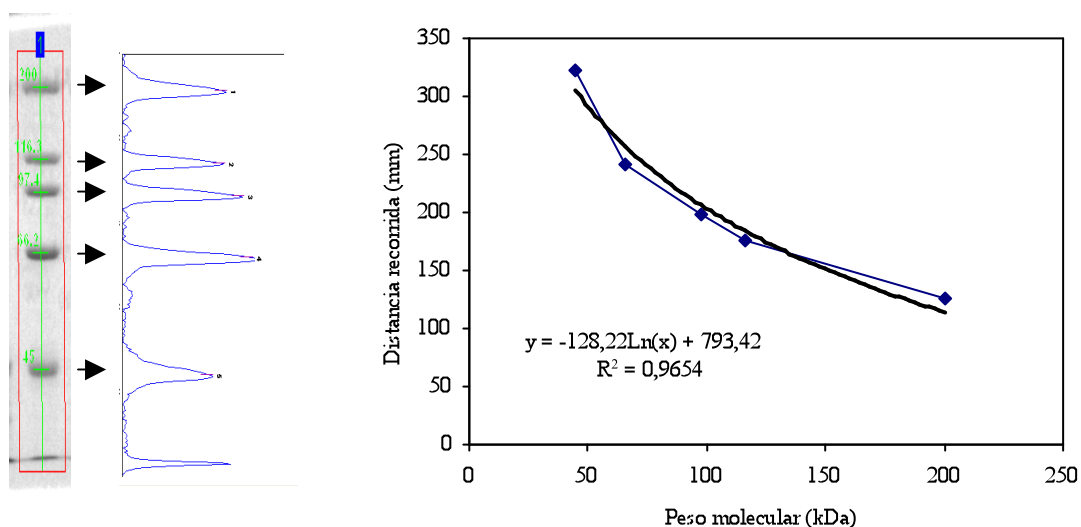
Análisis:

- 1) Mezclar 1 mL de la muestra y 3 mL del reactivo de biuret
- 2) Reposar durante 30 min
- 3) Leer la absorbancia en un espectrofotómetro en el rango de luz visible a $\lambda = 540$ nm contra un blanco de reactivos.
- 4) Los datos obtenidos se interpolan con una curva patrón de albúmina sérica bovina de concentración de 0- 10 mg/mL.

Curva patrón de albúmina sérica bovina para la determinación de proteína por el método de biuret



Anexo II. Curva patrón del marcador de pesos moleculares utilizado en SDS-PAGE



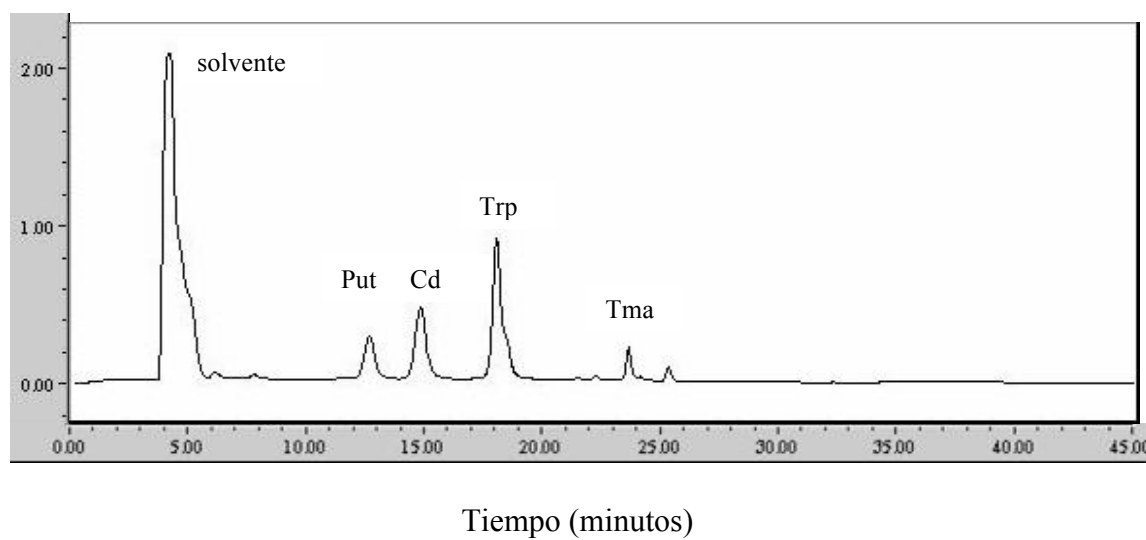
Las proteínas que contenía el marcador de peso molecular eran: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116.25 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina bovina (66.2 kDa), ovoalbumina (45 kDa)

Anexo III. Medio de cultivo para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*

Medio F

Peptona de caseína.....	10 g
Peptona de carne.....	10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O.....	1.5g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
Agar Bacteriológico.....	12 g
Glicerol.....	10 g
Agua destilada.....	1000 mL

Anexo IV. Cromatograma a 254 nm por HPLC de la separación aminas biogénicas determinadas en una columna de fase reversa Symmetry C18 (Waters) de 150 mm de longitud, 3.9 mm de diámetro y un tamaño de poro de 5 μm , con un flujo de 0.3 mL /min
Put: putrescina; Cd: cadaverina; Trp: triptamina; tma: trimetilamina.



Anexo V. Análisis de Varianza: músculo estriado de cazón, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos

Variable	P>	R ²	P>						
			Tiempo (t)	Enzima (E)*	Temperatura de almacenamiento (T)	Enzima x tiempo	Enzima x Temperatura	tiempo x Temperatura	Enzima x tiempo x Temperatura
Materia prima									
Actividad enzimática									
pH 4	0.0001	0.995	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.006	0.002
pH 6	0.0001	0.964	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.015	0.004
pH	0.0001	0.997	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Poblaciones microbianas									
Enterobacterias	0.0001	0.993	0.0001	0.344	0.0001	0.032	0.0001	0.711	0.301
Psicrótrofos	0.0001	0.989	0.0001	0.070	0.0001	0.138	0.0001	0.150	0.728
Concentración de aminas biogénicas									
Cadaverina	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Putrescina	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Triptamina	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
TMA	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Extracto proteico									
Capacidad de formación de emulsión	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.193	0.0001
Índice de actividad de emulsión	0.0001	0.959	0.0001	0.0074	0.0001	0.05	0.150	0.0075	0.002
Estabilidad de emulsión	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.085	0.0001	0.005	0.002	0.0001
Viscosidad aparente	0.0001	0.910	0.0001	0.066	0.0001	0.0001	0.0001	0.328	0.063
Grupos sulfhidrilos	0.0001	0.914	0.0001	0.250	0.0001	0.0287	0.048	0.9007	0.008
Emulsiones modelo									
Viscosidad aparente	0.0001	0.922	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Proteína adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.1424	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Proteína no adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.1424	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Geles									
Trabajo de penetración	0.0001	0.933	0.0001	0.003	0.0001	0.7730	0.0029	0.2111	0.1788

* enzima (E) – proteólisis por inoculación con extracto enzimático bacteriano (EB)
 proteólisis por enzimas endógenas (EE)

** las cifras en negrillas indican la ausencia de diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

Anexo VI. Comparación múltiple de medias de Duncan: músculo estriado de cazón, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos

Variable	Tiempo (días)				Temperatura (°C)		Enzima	
	0	5	10	15	4	15	Endógena EE	Exógena EB
Materia prima								
Actividad enzimática (UA)								
pH 4	177.333 ^d	314.083 ^c	626.833 ^b	763 ^a	433.375 ^b	507.250 ^a	395.208 ^b	545.417 ^a
pH 6	315.00 ^c	407.083 ^c	826 ^b	1417.916 ^a	611.96 ^b	871.04 ^a	467.50 ^b	1015.50 ^a
pH	5.7767 ^d	6.4183 ^c	7.4042 ^b	7.750 ^a	6.539 ^b	7.135 ^a	6.594 ^b	7.080 ^a
Poblaciones microbianas (ufc/g)								
Enterobacterias	1 ^d	1.2517 ^c	2.2917 ^b	3.667 ^a	1.895 ^b	2.209 ^a	2.170 ^a	2.054 ^a
Psicrótrosos	-	1.2750 ^c	2.8583 ^b	4.3167 ^a	1.795 ^b	2.4291 ^a	2.037 ^a	2.067 ^a
Concentración de aminas biogénicas (mg/kg carne)								
Cadaverina	0 ^d	1.29046 ^c	0.22439 ^b	4.98038 ^a	1.59036 ^b	2.65726 ^a	2.39527 ^a	1.85234 ^b
Putrescina	0 ^d	0.57918 ^c	1.26977 ^b	2.77441 ^a	1.03275 ^b	1.27892 ^a	0.86066 ^b	1.45100 ^a
Triptamina	0.01406 ^d	1.3352 ^c	0.85958 ^b	2.75304 ^a	0.38354 ^b	1.49656 ^a	0.75527 ^b	1.12483 ^a
TMA	0 ^d	0.21078 ^c	0.69816 ^b	1.66224 ^a	0.56867 ^b	0.66596 ^a	0.90597 ^a	0.30684 ^b
Extracto proteico								
Capacidad formación de emulsión (mL aceite/100 g)	405 ^a	346.416 ^b	273.944 ^c	183.333 ^d	308.180 ^a	296.167 ^b	297.375 ^b	306.972 ^a
Índice de actividad de emulsión (m ² /g proteína)	52.26 ^a	35.918 ^b	15.562 ^c	7.515 ^d	30.976 ^a	24.653 ^b	29.739 ^a	25.8902 ^b
Estabilidad de emulsión (min)	74 ^a	52.4167 ^b	14.8333 ^c	7.4167 ^d	37.45 ^a	36.875 ^b	37.916 ^a	36.416 ^b
Viscosidad aparente (Pa·s)	12.747 ^d	20.909 ^c	27.57b	35.013 ^a	20.120 ^b	28.002 ^a	22.999 ^a	25.123 ^a
Grupos sulfhidrilos (μmoles –SH/mg proteína)	77.49 ^a	43.818 ^b	74.331 ^a	78.43 ^a	71.007 ^a	66.033 ^b	67.54 ^b	69.49 ^a
Emulsiones modelo								
Viscosidad aparente (Pa·s)	1.0789 ^d	1.2136 ^c	1.4276 ^b	1.835 ^a	1.2612 ^b	1.5165 ^a	1.2821 ^b	1.4956 ^a
Proteína adsorbida (%)	61.820 ^d	64.3667 ^c	68.511 ^a	67.811 ^b	65.733 ^a	65.524 ^a	63.971 ^b	67.283 ^a
Proteína no adsorbida (%)	38.180 ^a	35.633 ^b	31.488 ^d	32.188 ^c	34.266 ^a	34.478 ^a	36.028 ^a	32.717 ^b
Geles								
Trabajo de penetración (N/s)	0.83667 ^a	0.76083 ^b	0.27750 ^c	0.110 ^d	0.58042 ^a	0.41208 ^b	0.5462 ^a	0.4462 ^b

Anexo VII. Análisis de Varianza: músculo estriado de cerdo, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos

Variable	P>	R ²	P>						
			Tiempo (t)	Enzima (E)*	Temperatura de almacenamiento (T)	Enzima x tiempo	Enzima x Temperatura	tiempo x Temperatura	Enzima x tiempo x Temperatura
Materia prima									
Actividad enzimática									
pH 4	0.0001	0.991	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
pH 6	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
pH 7	0.0001	0.996	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
pH	0.0001	0.848	0.0001	0.285	0.0001	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001
Poblaciones microbianas									
Enterobacterias	0.0001	0.990	0.0001	0.529	0.0001	0.618	0.0001	0.928	0.949
Psicrótrofos	0.0001	0.998	0.0001	0.364	0.0001	0.003	0.0001	0.033	0.0001
Concentración de aminas biogénicas									
Cadaverina	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Putrescina	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Triptamina	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Extracto proteico									
Capacidad formación de emulsión	0.0001	0.996	0.0001	0.0033	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Índice de actividad de emulsión	0.0001	0.9628	0.0001	0.0001	0.1040	0.0514	0.5062	0.0172	0.7783
Estabilidad de emulsión	0.0001	0.980	0.0001	0.0001	0.002	0.0001	0.0019	0.701	0.863
Viscosidad aparente	0.0001	0.997	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Grupos sulfhidrilos	0.0001	0.922	0.0001	0.0072	0.326	0.2922	0.0001	0.059	0.0001
Emulsiones modelo									
Viscosidad aparente	0.0001	0.979	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Proteína adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0125	0.0001	0.0001	0.1165	0.0001
Proteína no adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0125	0.0001	0.0001	0.1165	0.0001
Geles									
Trabajo de penetración	0.0001	0.9706	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.1478	0.0042

* enzima (E) – proteólisis por inoculación con extracto enzimático bacteriano (EB)

proteólisis por enzimas endógenas (EE) ** las cifras en negrillas indican la ausencia de diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

Anexo VIII. Comparación múltiple de medias de Duncan: músculo estriado de cerdo, y extractos proteicos, emulsiones y geles obtenidos

Variable	Tiempo (días)				Temperatura (°C)		Enzima	
	0	5	10	15	4	15	Endógena EE	Exógena EB
Materia prima								
Actividad enzimática (UA)								
pH 4	75.5417 ^d	215.5833 ^c	389.041 ^b	578.739 ^a	253.141 ^b	376.313 ^a	196.870 ^b	432.580 ^a
pH 6	128.312 ^d	226.4792 ^c	557.468 ^b	759.875 ^a	349.943 ^b	506.125 ^a	296.734 ^b	559.33 ^a
pH 7	238.750 ^d	397.760 ^c	511.677 ^b	732.292 ^a	419.141 ^b	521.099 ^a	318.990 ^b	621.250 ^a
pH	5.9 ^d	6.24 ^c	6.35 ^b	6.55 ^a	6.224 ^b	6.323 ^a	6.266 ^a	6.282 ^a
Poblaciones microbianas (log ufc/g)								
Enterobacterias	0	1.2250 ^c	2.1250 ^b	3.2917 ^a	1.366 ^b	1.954 ^a	1.645 ^a	1.675 ^a
Psicrótófos	0	1.0667 ^c	1.7283 ^b	4.008 ^a	1.4183 ^b	1.983 ^a	1.712 ^a	1.689 ^a
Concentración de aminas biogénicas (mg/kg carne)								
Cadaverina	0 ^d	0.16914 ^c	1.54196 ^b	2.71739 ^a	1.23849 ^a	0.97576 ^b	0.83038 ^b	1.38.386 ^a
Putrescina	0 ^d	0.11146 ^c	1.69242 ^b	1.97589 ^a	0.57688 ^b	1.31301 ^a	1.18339 ^a	0.70649 ^b
Triptamina	0.05133 ^c	0.041837 ^c	0.298080 ^b	0.66039 ^a	0.14312 ^b	0.38266 ^a	0.36150 ^a	0.16431 ^b
Extracto proteico								
Capacidad formación de emulsión (mL aceite/100 g)	459.667 ^a	475.667 ^b	407.986 ^c	256.417 ^d	414.750 ^a	385.118 ^b	392.005 ^b	407.813 ^a
Índice de actividad de emulsión (m ² /g proteína)	53.188 ^a	52.167 ^a	31.891 ^b	19.053 ^c	39.932 ^a	38.218 ^b	41.427 ^a	36.722 ^b
Estabilidad de emulsión (min)	66 ^a	40.75 ^b	17.333 ^c	5.833 ^d	33.375 ^a	31.583 ^b	35.75 ^a	29.208 ^b
Viscosidad aparente (Pa·s)	25.036 ^d	38.62 ^c	51.9208 ^b	80.5267 ^a	41.6925 ^b	56.3613 ^a	47.477 ^b	50.5758 ^a
Grupos sulfhidrilos (µmoles -SH/mg proteína)	76.587 ^a	74.331 ^a	52.883 ^b	55.619 ^b	65.455 ^a	64.254 ^a	66.587 ^a	63.123 ^b
Emulsiones modelo								
Viscosidad aparente (Pa·s)	25.80 ^d	28.354 ^c	35.264 ^b	40.952 ^a	28.395 ^b	36.793 ^a	30.300 ^b	34.888 ^a
Proteína adsorbida (%)	74.603 ^b	87.2117 ^a	30.625 ^d	41.874 ^c	58.346 ^a	58.811 ^a	59.315 ^a	57.841 ^b
Proteína no adsorbida (%)	25.396 ^c	12.780 ^d	69.374 ^a	58.125 ^b	41.653 ^a	41.180 ^a	40.684 ^b	42.158 ^a
Geles								
Trabajo de penetración (N/s)	1.46 ^a	1.289 ^b	0.8809 ^c	0.258 ^d	1.10417 ^a	0.8400 ^b	1.0704 ^a	0.8737 ^b

Anexo IX. Análisis de varianza: especies animales (cazón y cerdo)

Variable	P>	R ²	P>										
			Especie (S)	tiempo (t)	Temp (T)	Enzima (E)	S x t	S x T	S x E	S x E x T	S x t x E	S x t x T	E x t x E x T
Materia prima													
Actividad enzimática													
pH 4	0.0001	0.993	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0521	0.0001
pH 6	0.0001	0.973	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0137	0.0001	0.6398	0.0001	0.0001	0.0024
pH	0.0001	0.988	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Poblaciones microbianas													
Enterobacterias	0.0001	0.991	0.0001	0.0001	0.0001	0.2900	0.0001	0.0001	0.9881	0.8928	0.0868	0.0001	0.4783
Psicrótrofos	0.0001	0.993	0.0001	0.0001	0.0001	0.1696	0.0001	0.3130	0.0412	0.06042	0.3750	0.0001	0.0409
Concentración de aminas biogénicas													
Cadaverina	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.7506	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Putrescina	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Triptamina	0.0001	0.998	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Extracto proteico													
Capacidad formación emulsión	0.0001	0.990	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.2352	0.0001	0.0001	0.0001	0.0071
Índice de actividad de emulsión	0.0001	0.964	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0083	0.6147	0.1189	0.1303	0.0010	0.005
Estabilidad de emulsión	0.0001	0.997	0.0001	0.0001	0.0004	0.0001	0.0001	0.0592	0.0001	0.0442	0.0001	0.0058	0.0001
Viscosidad aparente	0.0001	0.988	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.4136	0.0971	0.1075	0.0018	0.1273
Grupos sulfhidrilos	0.0001	0.918	0.0001	0.0001	0.0037	0.4606	0.0001	0.0705	0.105	0.300	0.0853	0.0004	0.0001
Emulsiones modelo													
Viscosidad aparente	0.0001	0.98	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0014	0.0001	0.0001	0.005
Proteína adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.2654	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Proteína no adsorbida	0.0001	0.999	0.0001	0.0001	0.0001	0.2654	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Geles													
Trabajo de penetración	0.0001	0.968	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0352	0.0337	0.4029	0.0033	0.0271	0.11186

enzima (E) – proteólisis por inoculación con extracto enzimático bacteriano (EB)

 proteólisis por enzimas endógenas (EE)

 especie (S) - cazón, cerdo

** las cifras en negrillas indican la ausencia de diferencia estadística ($\alpha=0.05$)

Anexo X. Comparación múltiple de medias de Duncan entre especies animales (continua)

Variable	Especie	
	Cazón	Cerdo
Materia prima		
Actividad enzimática (UA)		
pH 4	314.727 ^b	470.313 ^a
pH 6	741.50 ^a	428.03 ^b
pH	6.837 ^a	6.2541 ^b
Poblaciones microbianas (log ufc/g)		
Enterobacterias	2.052 ^a	1.660 ^b
Psicrótrofos	2.112 ^a	1.7 ^b
Concentración de aminas biogénicas (mg/kg carne)		
Cadaverina	2.12381 ^a	1.10712 ^b
Putrescina	1.15583 ^a	0.94492 ^b
Triptamina	0.94013 ^a	0.26291 ^b
Extracto proteico		
Capacidad formación de emulsión (mL aceite/100 g)	302.174 ^b	399.934 ^a
Índice de actividad de emulsión (m ² /g proteína)	27.8147 ^b	39.074 ^a
Estabilidad de emulsión (min)	37.166 ^a	32.479 ^b
Viscosidad aparente (Pa·s)	24.0607 ^b	49.0269 ^a
Grupos sulfhidrilos (μmoles -SH/mg proteína)	68.520 ^a	64.855 ^b
Emulsiones modelo		
Viscosidad aparente (Pa·s)	1.3889 ^b	3.2594 ^a
Proteína adsorbida (%)	34.372 ^b	41.4213 ^a
Proteína no adsorbida (%)	65.6274 ^a	58.5788 ^b
Geles		
Trabajo de penetración (N/s)	0.4962 ^b	0.97208 ^a

Anexo X. Comparación múltiple de medias de Duncan entre especies animales (continuación)

Variable	Tiempo (días)				Temperatura (°C)		Enzima	
	0	5	10	15	4	15	Endógena EE	Exógena EB
Materia prima								
Actividad enzimática (UA)								
pH 4	126.438 ^d	264.833 ^c	507.938 ^b	670.870 ^a	343.258 ^b	441.781 ^a	489 ^a	296.039 ^b
pH 6	221.66 ^d	336.48 ^c	691.73 ^b	1088 ^a	480.95 ^b	688.58 ^a	382.12 ^b	787.42 ^a
pH	5.865 ^d	6.329 ^c	6.877 ^b	7.151 ^a	6.3818 ^b	7.729 ^a	6.430 ^b	6.681 ^a
Poblaciones microbianas (log ufc/g)								
Enterobacterias	0.5 ^d	1.238 ^c	2.208 ^b	3.479 ^a	1.631 ^b	2.081 ^a	1.841 ^a	1.871 ^a
Psicrótrofos	0	1.170 ^c	2.293 ^b	4.162 ^a	1.607 ^b	2.206 ^a	1.883 ^a	1.93 ^a
Concentración de aminas biogénicas (mg/kg carne)								
Cadaverina	0	0.7298 ^c	1.088318 ^b	3.8488 ^a	1.41442 ^b	1.81651 ^a	1.61283 ^a	1.61810 ^b
Putrescina	0	0.34531 ^c	1.48109 ^b	2.37514 ^a	0.804813 ^b	0.195966 ^a	1.02202 ^b	1.07875 ^a
Triptamina	0.03270 ^d	0.08783 ^c	0.57883 ^b	1.70672 ^a	0.26335 ^b	0.93969 ^a	0.55839 ^b	0.64465 ^a
Extracto proteico								
Capacidad formación de emulsión (mL aceite/100 g)	432.335 ^a	411.042 ^b	340.965 ^c	219.875 ^d	361.465 ^a	340.642 ^b	344.715 ^b	357.392 ^a
Índice de actividad de emulsión (m ² /g proteína)	52.217 ^a	44.553 ^b	23.726 ^c	13.282 ^d	35.451 ^a	31.4353 ^b	35.5832 ^a	31.3062 ^b
Estabilidad de emulsión (min)	70 ^a	46.583 ^b	16.083 ^c	6.625 ^d	35.416 ^a	34.229 ^b	36.833 ^a	32.812 ^b
Viscosidad aparente (Pa·s)	18.8917 ^d	29.7661 ^c	39.7473 ^b	57.7698 ^a	30.906 ^b	42.181 ^a	35.2389 ^b	37.8492 ^a
Grupos sulfhidrilos (µmoles -SH/mg proteína)	77.040 ^a	59.074 ^d	63.607 ^c	67.029 ^b	68.231 ^a	65.144 ^b	67.068 ^a	66.307 ^b
Emulsiones modelo								
Viscosidad aparente (Pa·s)	1.8298 ^a	2.0245 ^b	2.477 ^c	2.9653 ^d	2.0503 ^b	2.5979 ^a	2.1561 ^b	2.4922 ^a
Proteínas adsorbidas (%)	31.788 ^c	24.210 ^d	50.430 ^a	45.157 ^b	37.960 ^a	37.833 ^a	38.356 ^a	37.437 ^b
Proteínas no adsorbidas (%)	68.211 ^b	75.789 ^a	49.568 ^d	54.842 ^c	62.166 ^a	62.039 ^a	61.643 ^b	62.562 ^a
Geles								
Trabajo de penetración (N/s)	1.1483 ^a	1.025 ^b	0.579 ^c	0.1841 ^d	0.842 ^a	0.626 ^b	0.808 ^a	0.660 ^b

11. Productividad

Congresos:

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I. Effect of *Pseudomonas fluorescens* protease on model pork emulsions myofibrillar protein degradation. **IFT Annual Meeting 2007 Chicago, Illinois, EU.**

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I. Effect of endogenous proteases on sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) and pork myofibrillar protein degradation in a model oil/water emulsion. **IFT Annual Meeting 2006 Orlando, Florida, EU.**

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I. Efecto de una proteasa producida por *Pseudomonas fluorescens* en la elaboración de una emulsión cárnica modelo apartir de carne de cerdo. “**XXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ**”, 2006 Ixtapa Guerrero, Jalisco., México.

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G., Ponce-Alquicira, E & Guerrero Legarreta I Efecto de la proteólisis enzimática endógena y exógena en la formación de aminas biogénicas durante el almacenamiento de músculo de cerdo y cazón (*Rhizoprionodon terraenovae*) **V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 2005 Puerto Vallarta, Jalisco., México**

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I Physicochemical changes in pork and shark (*Rhizoprionodon longurio*) myofibrillar protein emulsions subjected to protease activity. **IFT Annual Meeting 2005, Nueva Orleans, EU.**

García-Barrientos R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I Caracterización parcial y comportamiento de proteasas endógenas durante el almacenamiento de carne de cerdo y cazón (*Rhizoprionodon terraenovae*) **2005 XXVI Encuentro Nacional de la AMIDIQ**, Acapulco, Guerrero., México

García-Barrientos, R., Pérez-Chabela M.L., Montejano, J. G. & Guerrero-Legarreta I. Textura y estructura de emulsiones modelo de especies de cerdo y cazón (*Rhizoprionodon longurio*): Efecto de proteasas. **2004 III Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Pamplona, España.**

García-Barrientos, R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I. Comportamiento de proteínas miofibrilares de cerdo y cazón (*Rhizopriondon longurio*) en una emulsión aceite/agua 2004, “XXV Encuentro Nacional de la AMIDIQ”, Puerto Vallarta, Jalisco., México.

García-Barrientos, R., Pérez-Chabela M.L., Montejano Gaitán G. & Guerrero Legarreta I. “Effect of endogenous proteases on pork and cazon (*Rhizopriondon longurio*) striated muscle”. IFT Annual Meeting 2003, Chicago, EU.

Publicación de artículo científico:

García-Barrientos, R., Pérez-Chabela, M.L., Montejano, J.G. y Guerrero-Legarreta, I. 2006. Changes in pork and shark (*Rhizopriondon terraenovae*) protein emulsions due to exogenous and endogenous proteolytic activity. Food Research International, 39:1012-1022.

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



Volume 39, issue 9, 2006
ISSN 0963-9969

FOOD RESEARCH INTERNATIONAL



Available online at
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Food Research International 39 (2006) 1012–1022

FOOD
RESEARCH
INTERNATIONAL

www.elsevier.com/locate/foodres

Changes in pork and shark (*Rhizopriondon terraenovae*) protein emulsions due to exogenous and endogenous proteolytic activity

R. García Barrientos^a, M.L. Pérez Chabela^a, J.G. Montejano^b, I. Guerrero Legarreta^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340 Mexico City, Mexico

^b Agriculture and Food Technology, ITESM, Campus Querétaro, Epigmenio González 500, Colonia San Pablo, C.P. 76130, Querétaro, Qro., Mexico

Received 1 March 2006; accepted 4 July 2006

Abstract

Protein unfolding is the main emulsifying mechanism in meat products. However, myofibrillar protein depletion resulting from endogenous or exogenous protease activity affects the emulsifying properties. The objective of this work was to study the effect of endogenous and exogenous proteases on protein depletion, emulsifying and viscosity properties in a model meat emulsion. Pork and shark meat were treated with a *Pseudomonas fluorescens* protease extract; endogenous proteolytic activity was studied in non-treated meat; samples were stored at 4 and 15 °C up to 15 days and emulsions formulated with extracted myofibrillar proteins. Endogenous proteolytic activity of shark meat extracts was significantly higher as compared to pork, promoting more extended protein degradation. This resulted in lower viscosity of protein extracts and emulsions. However, viscosity increased in both species throughout the study time, probably due to protein unfolding and molecular interaction. Emulsion capacity and stability increased in pork but decreased in shark, due to exogenous protease addition.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Emulsion; Muscle proteins; Proteolysis; Interphase; Microstructure; Viscosity

1. Introduction

The role of myofibrillar proteins in meat emulsions is mainly as system stabilizers at the oil/water interphase. However, the presence of proteases from endogenous or exogenous sources could alter the protein structure, hence changing the emulsion capacity and stability. Endogenous enzymes, such as cathepsins, located in the lysosomes, and calpains in the cytosol (Turk, Turk, & Turk, 2001) are related to meat protein depletion during storage (Koochma-raie, 1992; Taylor & Goll, 1995). During post-mortem handling meat microenvironment selects specific microflora, and consequently, specific enzymes are present. Among these enzymes, proteases produced by psychrothr-ophs such as *Pseudomonas* spp. (Porzio & Pearson, 1980)

promote tenderization by depleting myofibrillar proteins (Alanís, Lara, & Guerrero Legarreta, 1999). Therefore, if myofibrillar proteins are subjected to proteolytic activity their molecular, physicochemical and functional properties may change (Wilding, Lillford, & Regenstein, 1984).

Actin, myosin and actomyosin are responsible for most of the functional properties of meat; they contribute to approximately 95% of total water holding capacity of the meat tissue and 75–90% of the emulsifying capacity (Li-Chan, Nakai, & Wood, 1985). Although other emulsifying compounds are added at industrial level, myofibrillar proteins are the main emulsifiers in meat products, in addition of forming part the continuous phase. The ability of myofibrillar proteins to form the interphase depends on intrinsic parameters (molecular shape and form, amino acid composition and hydrophobicity, among others) as well as extrinsic conditions (pH, temperature, ionic strength) and processing. Emulsion stability is also dependent of

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5804 4717; fax: +52 55 5804 4712.
E-mail addresses: meat@xanum.uam.mx, isabel_guerrero_legarreta@yahoo.com (I. Guerrero Legarreta).

these conditions (Gordon & Barbut, 1992). Functionality of meat protein is reported being species-specific (Jiménez-Colmenero & Borderías, 1983) as well as depending on originating in the smooth or striated muscle (Borderías, Lamua, & Tejada, 1983; Whiting, 1988). Differences seem to be related to polymorphism; in the case of light meromyosin its molecular weight is both, species- and muscle-specific (Smith, 1988).

The effect of exogenous enzymes from bacterial sources has been reported by several authors. Naguib, Ayesh, and Shalaby (1995) found unspecific protein breakdown; whereas Alanís et al. (1999) reported that protease extracts obtained from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* mainly act on actin and high molecular weight intermediate proteins. In addition of *Pseudomonas* spp. other protease-producing Gram negative bacteria are present in meat stored under refrigeration, such as *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* and *Aeromonas*. However, pseudomonads are the most active proteolytic bacteria in meat (Venugopal, 1990).

Striated muscle of marine species has also emulsifying properties; they are commonly used in various meat products as an alternative for consumers with restricted intake of meat from land animals (Cofrades, Carballo, Carenche, & Jiménez-Colmenero, 1996). However, fish endogenous proteases are highly active (Martin, Cash, Blamey, & Houlihan, 2001) resulting in fast protein depletion and, as consequence, loss of functional properties (Borderías et al., 1983).

The objective of this work was to study the effect of endogenous and exogenous proteases in a model emulsion formulated from extracted pork and sharpnose shark (*Rhizopriondon terraenovae*) myofibrillar proteins, in relation to protein depletion, emulsifying and viscosity properties, and emulsion microstructure.

2. Materials and methods

2.1. Raw material

Pork was obtained from five animals 24 h after slaughtering in a certified local abattoir; no ante mortem handling was recorded. Pork *Longissimus dorsi* muscles were excised and taken to our laboratory within 20 min in a portable cooler at 4–6 °C. Sharpnose shark was caught at the Gulf of Mexico's coast and transported in ice to the Central Food Market "La Viga" in Mexico City. Samples were taken from 5 animal fillets approximately 10 h after catching, and transported to our laboratory under the same conditions of pork samples.

In order to reduce surface microbial contamination, approximately 5 mm of the muscle surface of both species were cut with sterile knives in aseptic conditions in a laminar flow cabinet. Muscles were then sectioned into 50 g portions, and stored at 4 °C in plastic bags until utilization, approximately 15 min later.

2.2. Peak endogenous protease activity of pork and shark meat raw meat

pH was measured in 10 g meat homogenized with 90 mL distilled water for 1 min; the slurry was filtered and pH measured in the filtrate with a potentiometer (Beckman, Fullerton, CA).

Endogenous enzyme extracts were prepared from raw pork and shark meat by homogenizing 10 g meat with 20 mL 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, at 4 °C, and centrifuged at 8000g for 30 min; the endogenous enzymatic extract was in the supernatant; proteolytic activity analysis was carried out in this fraction.

Peak endogenous enzymatic activity was analyzed in meat samples by the methods described by Kunitz (1947) and Anson (reported by Ouali & Valin, 1980) at pH 1–9 in pork extracts, and pH 2–12 in shark extracts, after 5–60 min reaction time in both animal species. One milliliter enzyme extract (1.37 mg protein) was mixed with 0.25 mL substrate (hemoglobin for acid pH and casein for neutral and alkaline) and incubated at 37 °C for 10 min. The hemoglobin substrate was prepared by mixing 1% hemoglobin with 0.025 M boric acid + 0.25 M acetic acid, pH was adjusted to 4. The solution was heated at 60 °C for 20 min, cooled down to room temperature (approximately 18 °C) and stored at 4 °C. The casein substrate was prepared with 1% casein and 2 mM CaCl₂ in 50 mM phosphate buffer (sodium dibasic and monobasic phosphates), pH 7.0. The reaction was stopped by adding 3 mL 5% trichloroacetic acid. The mixture was left standing for 30 min at room temperature (18 °C) and centrifuged at 2000g in a Beckman centrifuge model U94 8885, JA-14 rotor (Beckman, Palo Alto, CA); the precipitate was discarded, the absorbance was read in the supernatant at 280 nm in a Beckman spectrophotometer, model DU-60. The proteolytic activity was obtained by the following equation (Ouali & Valin, 1980):

$$PA = (\text{absorbance} * \text{dilution}) / [(0.001)(\text{time})(\text{extract volume})]$$

2.3. Production of *P. fluorescens* protease extract

The effect of exogenous enzymes was studied in meat of both animal species inoculated with a crude protease extract obtained from *P. fluorescens*, isolated from beef in our laboratory (Alanís et al., 1999). The strain was inoculated in TSB medium and incubated with continuous stirring at 19 °C for 48 h. The cell fraction was separated by centrifuging at 16,300g for 15 min at 4 °C; the supernatant was filtered through 0.45 mm Millipore membrane (Bedford, MA). The protease extract was precipitated with 65% ammonium sulfate, separated by centrifugation at 16,000g for 15 min, resuspended in a minimum volume of 50 mL Tris-HCl + 0.1 KCl buffer, pH 7.5, at 4 °C, dialyzed against 50 mM Tris-HCl + 0.6 M KCl buffer and stored at 4 °C. Proteolytic activity of the bacterial enzyme extract was analyzed according to the method described by Kunitz

(1947). One percent casein broth was mixed to 2 mM CaCl₂ in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The substrate and enzymatic extract were incubated at 37 °C for 1 h. The reaction was stopped by mixing 3 mL 5% trichloroacetic acid. The amount of hydrolyzed casein was obtained by interpolation in a standard curve. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce 1 mM tyrosine/min at 37 °C in 2.5 mL (mM tyrosine/min mL) reaction mixture read at 280 nm.

2.4. Meat inoculation with *P. fluorescens* crude protease extract

Samples were treated with the exogenous protease by immersion of finely cut (20 × 10 × 2 mm) pork and shark meat samples in 20 mL crude *P. fluorescens* protease extract (protease activity: 3.92 AU/mL) for 60 min.

2.5. Exogenous and endogenous proteolytic activity during storage

The effect of endogenous proteases was studied in treated and non-treated samples, cut into similar size as above. A 46.1 kDa very active protease and maximum activity at pH 7.5, 37 °C was present in the extract, according to Alanís et al. (1999). Pork and shark samples with the bacterial protease, as well non-treated samples were stored at 4 °C (usual refrigeration temperature) and 15 °C (abuse temperature condition) for 15 days total study time.

Ten grams sample from each animal species was taken at days 0, 5, 10 and 15; they were homogenized with 20 mL 20 mM phosphate buffer, pH 7, at 4 °C, and centrifuged at 8000g for 30 min; the supernatant contained the enzyme extract. Acid protease activity (pH 4) was analyzed on hemoglobin substrate, and neutral protease activity (pH 6 and 7), as described before.

2.6. Meat protein extraction and SDS-PAGE

Myofibrillar protein extraction was carried out from inoculated and non-inoculated pork and shark meat at 5-day intervals, according to the method described by Ngapo, Wilkinson, Chong, and Haisman (1992). Homogenized meat samples in water and ice (1:1:1) were stirred for 10 min in an ice bath, the connective tissue was separated by filtration through a cheese cloth; 100 mL cold water (approximately 6 °C) was mixed and the stirring continued for 15 min. The homogenized mixture was centrifuged at 4000g for 30 min, 4 °C; the supernatant was discarded and the precipitate resuspended in 0.6 M NaCl, 50 mM phosphate buffer, pH 7. Protein concentration was analyzed in the extract by the method described by Laemmli (1970).

Protein degradation was analyzed by SDS-PAGE, according to the methods described by García, Dimes, and Haard (1993) and Laemmli (1970) in 12% polyacrylamide separation gels and 4% stacking gels in a Mini-Protein II slab cell (Bio-Rad, Richmond, CA); 5 mg/mL

protein samples and a mixture of molecular weight markers ranging from 205 to 29 kDa (204 kDa myosin, 116 kDa β-galactosidase; 97.4 kDa phosphorilase b; 66 kDa bovine serum albumin; 45 kDa egg albumin; 29 kDa carbon anhydrase) (Sigma C3312) were applied to the gels. The analysis was carried out at 200 V constant voltage, 4 ± 1 °C. The gels were stained with 0.1% Coomassie R-250 + 40% methanol + 10% acetic acid, for 30 min, and destained in 40% methanol + 10% acetic acid. The gels were scanned in a Gel-Doc 2000 (Bio-Rad) fitted with a Quantity One™ software, version 4 (Bio-Rad), to obtain the protein band densitograms.

2.7. Emulsion formulation from protein extracts

Emulsions were formulated with proteins extracted at 5-day intervals from pork and shark meat samples stored at 4 and 15 °C. Fifty percent myofibrillar protein extract, 35% phosphate buffer (pH 7) and 15% corn oil were homogenized at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C, the final protein concentration in the emulsion was analyzed by the method reported by Laemmli (1970). Emulsion pH was 7.0 throughout the study time.

2.8. Emulsion particle size, apparent viscosity, stability and emulsifying capacity

Emulsion particle size and distribution were analyzed in a Malvern Mastersizer equipment, Series 2600 (Malvern Instruments, Malvern, England) applying a log normal model (MacClemens, 1999). Apparent viscosity was analyzed with a Brookfield LVDV-1 viscometer (Brookfield Engineering Laboratory, Middleboro, MA) at 8 deformation speeds: 0.3, 0.6, 1.0, 1.5, 12, 39 and 60 rpm; the spindle was chosen according to the deformation speed. Apparent viscosity was calculated considering a torque between 20% and 60%.

Emulsion capacity was analyzed according to the method reported by Swift, Lockett, and Fryar (1961) based on sample electric resistivity. An acrylic cylinder (32 mm diameter, 100 mm high), one end closed, was fitted with two copper wires passing through holes drilled 1 cm from the closed end and attached to a digital voltmeter (Tektronics CDM 250, Tektronics, Beaverton, OR). Five milliliters protein solution (5 mg protein/mL) were placed in the cylinder; corn oil was added with continuous stirring at 1 mL/s. Emulsifying capacity was reported as milliliters of added oil at the point where resistivity was interrupted and related to g protein. Emulsion stability was analyzed according to Cofrades, Bañon, Carballo, and Jiménez-Colmenero (2003); 0.5 mL protein solution was suspended in 4.5 mL-1% SDS fractions, until phase separation was observed.

2.9. Emulsion SEM

Emulsion samples were fixed by immersion for 24 h in 5% glutaraldehyde in 50 mM phosphate buffer + 0.6 M

NaCl, pH 7.4, and 1% osmium tetra oxide for 2 h; they were then sequentially washed twice with 30–100% absolute ethanol. Samples were dried with CO₂ (1070 psi at 30 °C) in a Samdri-780 B critical point drier system (Tousimis Research Co., Rockville, MD) and mounted on aluminium stubs. They were then coated with a carbon layer and a second layer of approximately 200–300 Å of gold-palladium using a Bal-Tec SCD sputter (Lichtenstein). The samples were examined with a Jeol SEM (Jeol JSM-5900 LV, Japan) at 10 kV; magnifications were tried until adequate image was obtained.

2.10. Experimental design and statistical analysis

Samples were assigned to a completely randomized design; the sources of variation were: animal species (pork and shark), storage temperature (4 and 15 °C), storage time (0, 5, 10, 15 and 20 days), enzyme [endogenous (calpains and cathepsins) and exogenous (bacterial)]. The response variables were: for protein extracts: pH and apparent viscosity; for emulsions: apparent viscosity, emulsifying capacity and emulsion stability. Data was subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range test (Steel & Torrie, 1988) using a SAS program adapted to a personal computer, version 6:12 (SAS Institute, 1996). Three replicates were analyzed from each one of the five sampled animals, making a total of 15 analysis.

3. Results and discussion

3.1. Proteolytic activity in raw samples

Endogenous proteolytic activity after rigor mortis resolution is documented in several species (Ilian, Bickerstaffe,

& Greaser, 2003; Moldoveanu, Hosfield, Jia, Elce, & Davies, 2001; Steen, Claeys, Uytterhaegen, De Smet, & Demeyer, 1997). Three proteases were observed in pork (peak activities at pH 4, 6 and 7), whereas two proteases were present in shark (peak activities at pH 4 and 6). Proteolytic activity decreased as reaction time increased; the maximum activity in both species was observed at 5 min reaction rate whereas at 60 min activity was almost negligible, probably due to autolysis. The same trend was observed in both species.

3.2. Endogenous proteolytic activity during storage

Once the maximum activity pH was found, proteolytic activity in pork and shark samples were studied at these maxima, i.e. pH 4, 6 and 7 in pork and pH 4 and 6 in shark; samples were stored at 4 and 15 °C (Fig. 1). Reports on meat proteolysis are generally carried out at 4 °C, normal refrigeration temperature; 15 °C is a condition of temperature abuse that may occur during failure in energy supply, inadequate handling or lack of suitable refrigeration frequently found in subtropical areas (Guerrero Legarreta, Mendiola, Ponce, & Prado, 1995). Proteolytic activity increased throughout the study time in all storage conditions; significant differences were observed in pork and shark due to time, temperature and pH ($P < 0.001$). As expected, proteolytic activity was significantly higher ($P < 0.001$) in samples treated with *P. fluorescens* protease extract as compared to non-inoculated samples where proteolysis was only a result of endogenous activity. Samples stored at 15 °C showed higher activity; due that optimum activity of *P. fluorescens* proteases is 37 °C, the closer the storage temperature to the optimum, the higher the activity (Alanís et al., 1999). Mean proteolytic activity was significantly higher at 15 °C

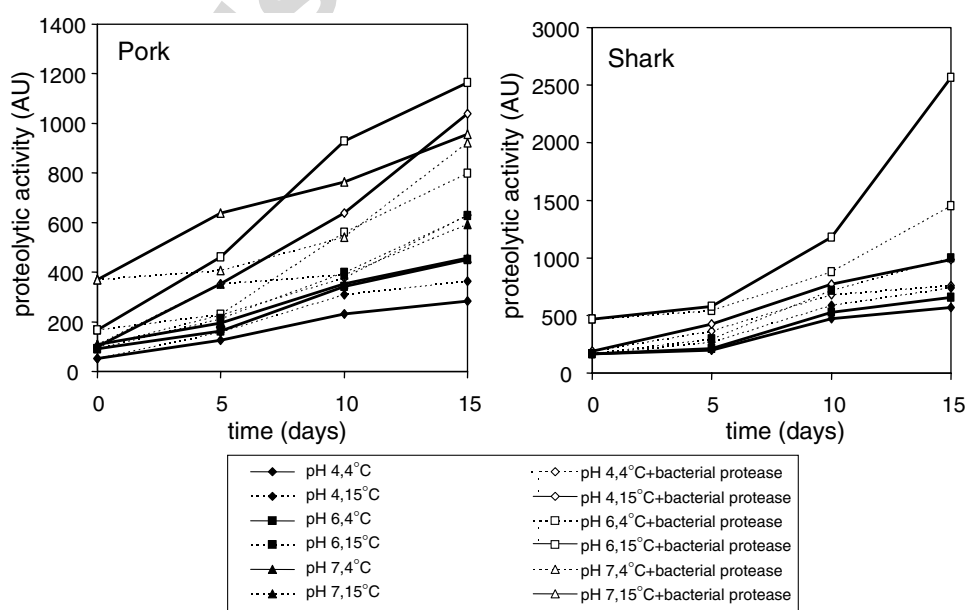


Fig. 1. Proteolytic activity of treated and non-treated pork and shark meat.

(376.31 ± 26.31, 506.12 ± 34.41 and 521.09 ± 34.39 AU at pH 4, 6 and 7, respectively) than at 4 °C (253.14 ± 17.97, 349.94 ± 21.69 and 419.14 ± 24.72 AU at pH 4, 6 and 7, respectively). Non-treated samples also showed higher activity at 15 °C, pH 6 and 7. Although the bacterial protease extract was more active (432.58 ± 18.15, 559.33 ± 36.35 and 621.25 ± 36.65 AU at pH 4, 6 and 7, respectively) than endogenous proteases (196.87 ± 13.78, 296.73 ± 17.21 and 318.99 ± 14.35 AU at pH 4, 6 and 7, respectively) endogenous proteolysis also played an important role in the emulsion.

Proteolytic activity was considerably higher in shark than in pork ($P < 0.001$), although in shark only two proteases were found. Shark samples treated showed the highest proteolytic activity (2563.0 ± 174.53 AU at 15 days of storage, pH 6, 15 °C) ($P < 0.001$), in agreement with other authors who reported highly active proteases in marine substrates (Martin et al., 2001). At 15 days of storage, pH 6, 4 °C, the maximum activity of non-treated samples was observed (627.1 ± 37.62 AU and 1000.1 ± 63.00, in pork and shark, respectively). Proteolytic activity between pork and shark was significantly different at pH 4 and 6 ($P < 0.001$).

3.3. pH

Shark pH was significantly higher ($P < 0.001$) (Fig. 2), in agreement to other authors (Cofrades et al., 1996; Li-Chan et al., 1985) who reported that pH in marine animals is higher than in land animals. At 15 days of storage, pH of shark samples was 7.95 ± 0.166 to 8.15, whereas in pork samples pH was 6.44 ± 0.06 to 6.63 ± 0.079. Low bacterial population in both animal species, due to previous sterilization resulted in low counts at time 0 (Table 1). Shark sam-

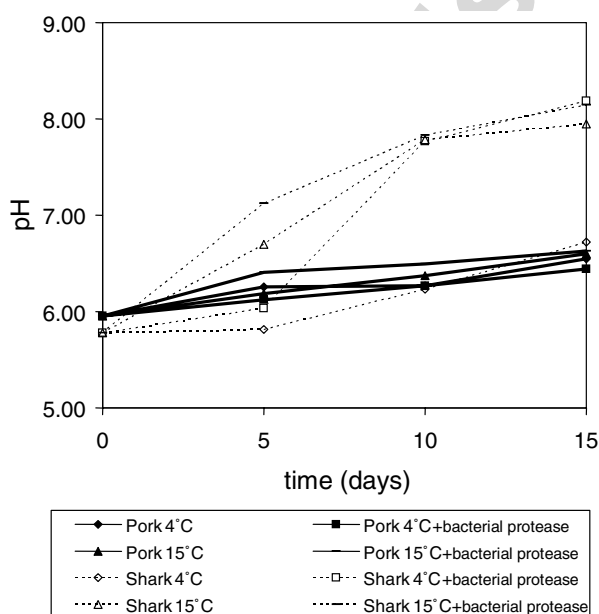


Fig. 2. pH of pork and shark raw meat.

Table 1
Microbial counts at 0 and 15 days of storage (\log_{10} CFU/g)

	Enterobacteria (day)		Psychrothrophs (day)	
	1	15	1	15
<i>Shark</i>				
4 °C	1	3.1	0	3.9
15 °C	1	4.1	0	4.7
<i>Pork</i>				
4 °C	0	2.4	0	3.5
15 °C	0	4.1	0	4.5

ples, with no bacterial protease added, stored at 4 °C was approximate pH 6.0 throughout the study time, as a result of moderate growth of native microflora, controlled by refrigeration conditions (Venugopal, 1990). Pork pH was close to that for optimum proteolytic activity (pH 6 and 7).

Conversely, shark pH (treated and non-treated with the bacterial protease) reached values higher than the optimum for protease activity (pH 4.0 and 7.0) (Fig. 2), i.e. pH was as high as 7.83 ± 0.11 at day 10. However, proteolytic activity was significantly higher in shark than in pork ($P < 0.001$) (Fig. 2), where pH remained within a closer range (5.95 ± 0.05 to 6.63 ± 0.06) to pH for maximum activity of one protease (pH 6.0). Removing shark meat from its natural environment promotes rapid deterioration producing amines which, in turn, increase pH (Naguib et al., 1995).

3.4. Protein degradation

Although only two proteases were found in non-treated shark as compared to three proteases in pork, enzymatic activity in shark meat at 15 °C, pH 6, was significantly higher (1000.1 ± 63.0 AU) than in pork (627.1 ± 37.62 AU) at 15 days of storage. This was due to very active proteases in shark muscle, as reported in marine animals by other authors (García et al., 1993; Martin et al., 2001). It was assumed that proteolysis was only due to endogenous enzymes or to added bacterial protease extract, confirmed by preliminary studies showing low microbial counts at 15 days of storage (Table 1). As the peak *P. fluorescens* protease activity is pH 7.5 (Alanís et al., 1999), at pH around 7 maximum protein degradation occurs in shark samples as it is close to bacterial and endogenous protease peak activity.

Intensive proteolysis was evident in shark; although pork and shark myofibrillar proteins had similar molecular weight at day 0, more degradation, i.e., more dense bands of low molecular weight (lower than 124 kDa) were observed at 5 and 10 days in shark samples (Fig. 3). Protein degradation was more intense in samples treated with *P. fluorescens* protease extract and stored at 15 °C for 15 days, as shown by the presence of low molecular weight bands (<45 kDa), produced by myosin (204 kDa), intermediate protein (around 140 kDa) and regulatory protein (50–85 kDa) degradation; a band at 30–36 kDa band was

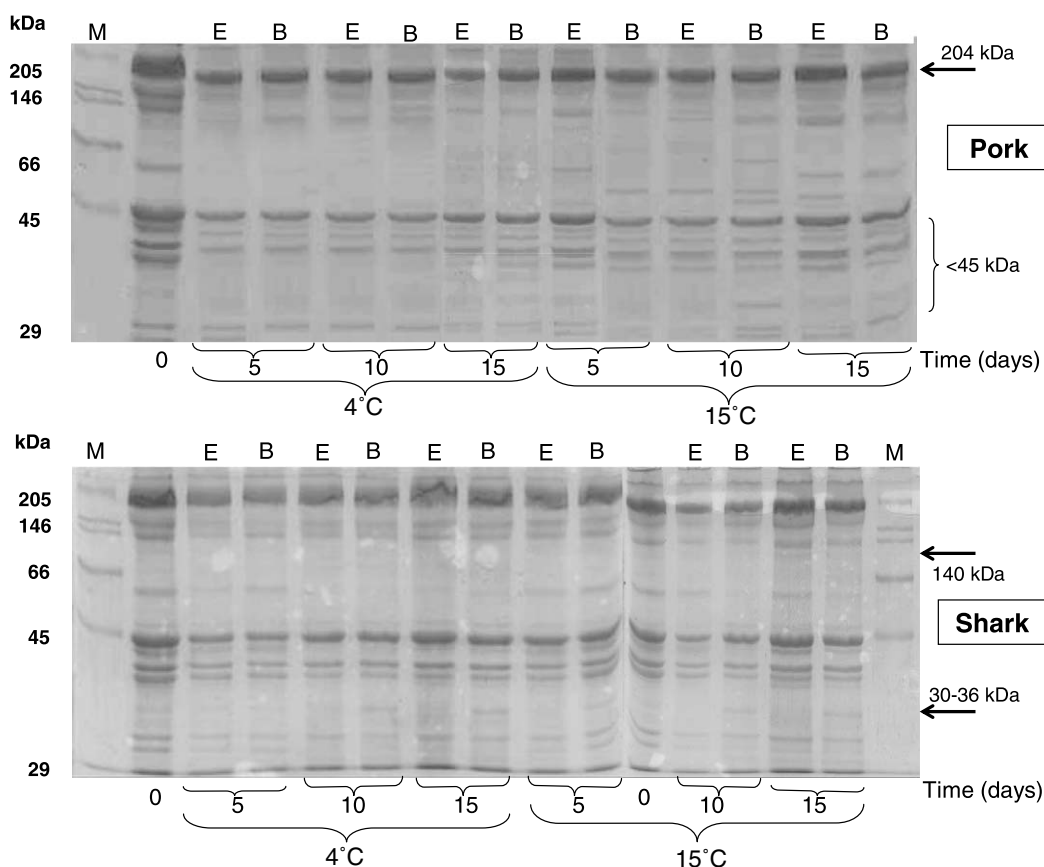


Fig. 3. SDS-PAGE of pork and shark myofibrillar proteins. M: molecular weight markers; B: proteolysis by a bacterial protease extract.

evident in shark samples treated with the bacterial protease, as well as a 66 kDa band in all samples. Lower, non-significantly different ($P > 0.01$) degradation of actin and myosin was observed in non-treated samples. Shark is considered as an autolytic species, due to the number and activity of proteases present in the muscle (Visessanguan & An, 2000), or to the presence of isoenzymes, reported by Martin et al. (2001). However a number of specific protein reactions in marine species may also account for high molecular weight bands in fish after several days of storage (Chen, Hwang, & Jiang, 1989) such as formation of disulfide bonds. A 140 kDa band was observed in our study at day 15, possibly due to protein–protein interaction, or aggregation of myosin isoforms (Liu, Foegeding, Wang, Smith, & Davidian, 1996). Several authors (Martin et al., 2001; Martínez, Ofstead, & Olsen, 1990) reported the presence of myosin isoforms in marine fish muscles that can also be sensitive in various degrees to endogenous isoenzymes, as well as to bacterial proteases, accounting for degradation into peptides of a wider molecular weight range than myosin from land animals.

SDS-PAGE of pork protein extracts also showed changes in >200 kDa myofibrillar proteins stored at 4 and 15 °C, evident by the presence of small peptides (lower than 45 kDa) in treated and non-treated samples. However, band density was lower than in shark samples, a possible result of lower degradation of high molecular weight pro-

teins in pork than in shark meat. Porzio and Pearson (1975) reported the activity of a neutral protease from *P. fluorescens* acting on myofibrillar proteins and rendering three fractions: heavy meromyosin, light meromyosin and premyosin with molecular weight from 80 to 175 kDa. Medium and low molecular weight bands are also the results of intermediate proteins also hydrolyzed by endo and exo protease (Fritz & Greaser, 1991). Alanís et al. (1999) reported that degradation of myosin and actin by enzymatic extracts obtained from *P. fluorescens* was almost completed after 4 h of hydrolysis. These authors also reported the presence of two high molecular weight peptides (124–151 kDa) formed from actomyosin and high molecular weight proteins (myosin + actin + regulatory proteins). Lower proteolytic activity observed in pork (Fig. 1) was in agreement with SDS-PAGE analysis, as activity in shark was significantly higher and bands were denser. Conversely as with shark, pork myofibrillar proteins did not present myosin isoforms; therefore protease activity resulted in lower degradation, as observed in SDS-PAGE as lower bands in the range of 29–45 kDa, and 45–146.

3.5. Apparent viscosity of protein extracts and emulsions

Increase in protein extract apparent viscosity (Fig. 4A) occurred at the same time of increasing proteolytic activity

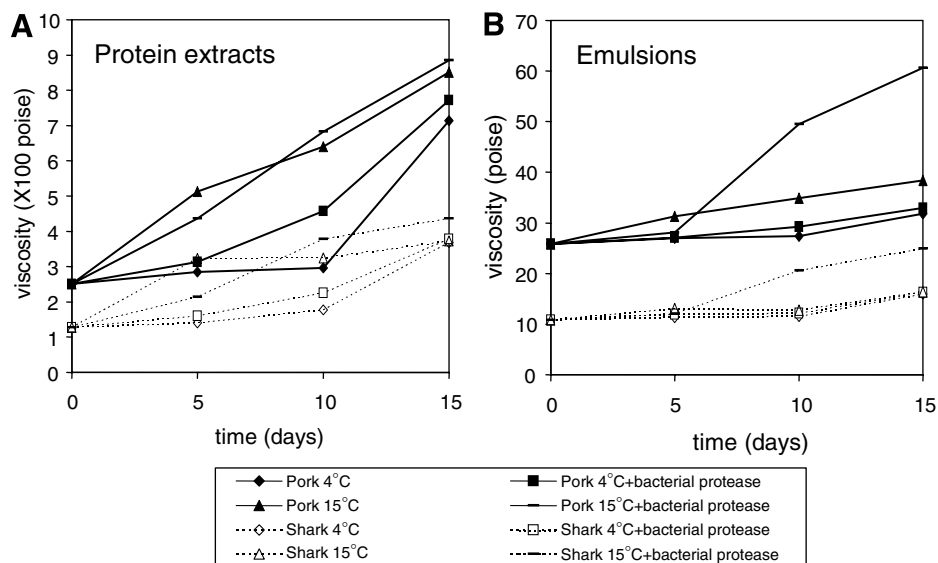


Fig. 4. Apparent viscosity of protein extracts and emulsions.

(Fig. 1) and protein degradation (Fig. 3). Cofrades et al. (2003) reported an increase in raw meat batter viscosity as a result of enzymatic activity that promotes protein–protein interaction; on the other hand, aggregation of myosin isoforms (Liu et al., 1996) and formation of disulfide bonds (Chen et al., 1989) have been also reported. Significant differences were also observed, both in pork and shark, between samples stored at 4 and 15 °C ($P < 0.001$), but not between inoculated and non-inoculated samples ($P > 0.01$).

Apparent viscosity of protein extracts was significantly higher ($P < 0.001$) in pork than in shark (Fig. 4A), probably as a result of higher endogenous enzymatic activity as storage temperature was increased; the overall result was myofibrils destruction and protein unfolding (Pérez, Escalona, & Guerrero Legarreta, 1998). This fact promoted an increase in protein hydrodynamic radius (Steffe, 1996). However, excessive proteolysis in shark samples promoted protein degradation to smaller peptides (Fig. 3); viscosity was therefore considerably lower than in pork. Pork protein extracts stored at 15 °C showed the highest viscosity at 15 days of storage (885.4 ± 12.01 and 851.0 ± 9.32 poise, inoculated and non-inoculated samples, respectively), whereas shark protein extracts had a viscosity at day 15 as low as 436.7 ± 7.41 poise in inoculated samples stored at 4 °C.

Protein concentration in the emulsions of both animal species was 25 mg protein/mL, therefore difference between animal species were not due to protein content. All emulsions showed monodisperse particle size distributions at time 0. Particle size distribution was the same for both animal species ($5.31 \pm 0.06 \mu\text{m}$). Due to the high molecular weight of myofibrillar proteins (450–205 kDa) they behaved as particles in suspension (Li-Chan et al., 1985), therefore the system stability depends on colloidal factors such as medium ionic strength and particle shape, surface

charge and distribution (Dickinson, 2003). Having similar particle distribution and being in the same medium ionic strength, differences in emulsion viscosity was due to particle shape and charge. Viscosity also decreased with increased protein degradation, as observed in samples treated with *P. fluorescens* protease (Fig. 4B). On the other hand, the electric charge seems not to affect shark protein extracts as proteins are to close to neutrality. Pork proteins could affect protein extract viscosity as final pH is 5.5; repulsion can be a net effect in this species protein.

Emulsion apparent viscosity behaved in a similar way, although with lower values, as protein extracts, there was a significant difference between animal species ($P < 0.001$); emulsion viscosity was considerable lower than protein extract viscosity. This was a result of a homogenous particle shape as compared to an irregular shape of extracted myofibrillar proteins (Gordon & Barbut, 1992; MacClemens, 1999). There was no significant difference ($P > 0.01$) between shark and pork protein extract viscosity. The highest value observed for both species was at 15 days of storage, (60.61 ± 0.92 poise in pork and 24.94 ± 0.54 poise in shark). Differences in myofibrillar protein isoelectric point partially account for this difference, as pork and shark emulsions were formulated at pH 7.0; the protein surface charge affects viscosity due to charge interaction. Fish protein pI is around 6.5 (Martínez et al., 1990), as compared to the average isoelectric point of striated proteins (5.5).

Shark samples treated with the bacterial protease had lower viscosity (emulsions and protein extracts), as compared to pork emulsions due to more extensive shark protein depletion by *P. fluorescens* proteases, as observed by SDS–PAGE (Fig. 3) especially when stored at 15 °C. This could be due to: (a) protein sensitivity due to the presence of myosin isoforms in shark; (b) lower protein exposure in the emulsion.

As observed under SEM, shark emulsions made meat treated with the bacterial protease and stored at 4 °C showed larger structures (Fig. 5C) than pork emulsions (Fig. 5F). At time 0, structures of both species had approximately the same size (Fig. 5A and D), decreasing during storage (Fig. 5B and E). However, pork emulsions showed smaller globules surrounded by proteins; shark samples had larger globules, not completely surrounded by proteins. Globule size of treated and non-treated samples was similar in both animal species at 15 days.

There were no significant difference ($P < 0.01$) among emulsion viscosity in samples stored at 4 and 15 °C, and 4 °C without the bacterial protease for each species. Conversely, significant differences were observed between samples treated with the bacterial protease at stored at 15 °C in each species. Storage temperature and animal species had a significant effect ($P < 0.001$) on emulsion viscosity.

3.6. Emulsion capacity and stability

Myofibrillar proteins are good emulsifiers due to their amphipathic structure; the hydrophobic part attaches to the globule whereas the hydrophilic part to the aqueous environment, decreasing surface tension and stabilizing the system. However, due to the enzymatic activity present throughout storage, protein configuration changed, smaller peptides were produced and the surface activity was reduced (Damodaran & Razumovsky, 1998). At day 15, exo- and endo-proteases had their maximum activity; this was related to the decrease in emulsion capacity and stability. As discussed before, excessive proteolysis resulted in formation of low molecular weight peptides, with a considerable reduction in emulsifying capacity as compared to proteins that underwent limited degradation; high molecular weight proteins in shark could also account for the

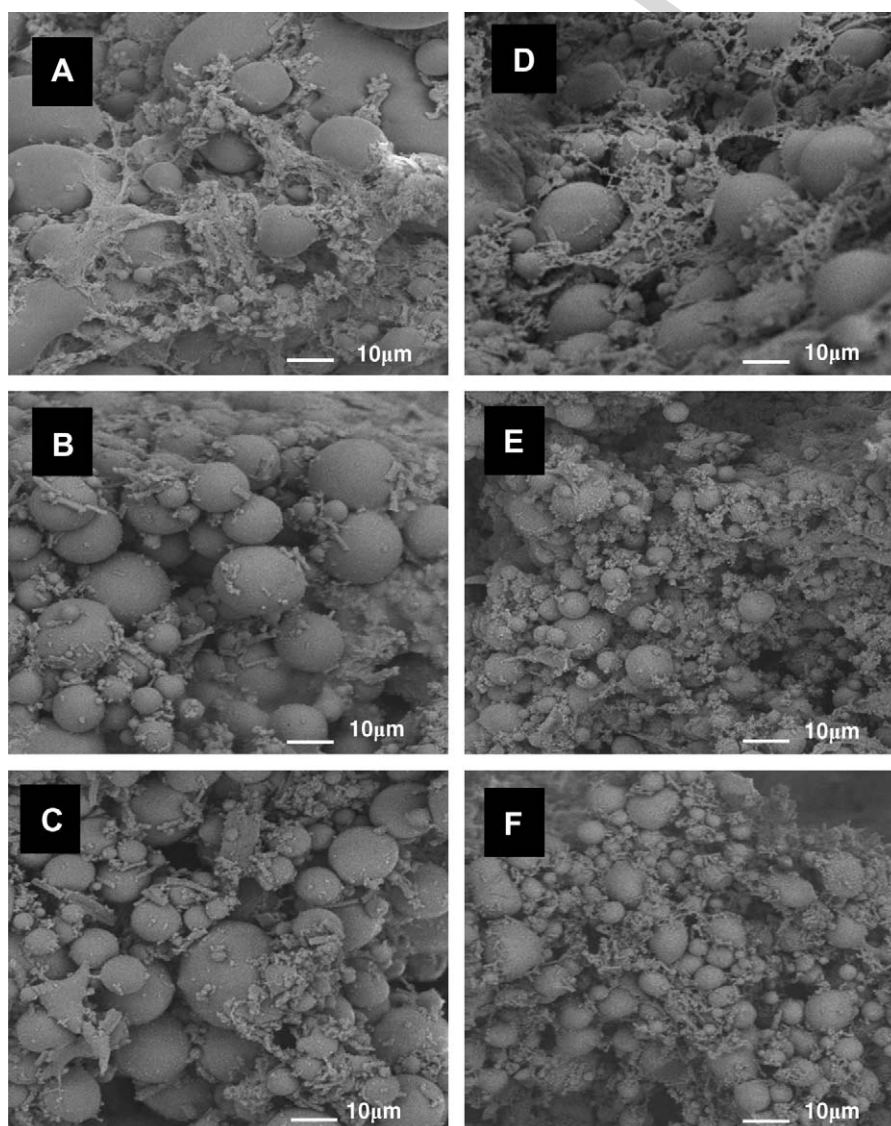


Fig. 5. Scanning micrographs of model emulsions from samples stored at 4 °C: (A) shark at 0 days; (B) shark at 15 days no bacterial protease added; (C) shark at 15 days treated with a bacterial protease extract; (D) pork at 0 days; (E) pork at 15 days no bacterial protease added; (F) pork at 15 days treated with a bacterial protease extract.

reduction of emulsifying properties. Therefore, deterioration of the emulsion depends mainly on exo- but also on endo-peptidase activity. Although maximum emulsifying capacity occurred in both species at 5 days of storage (555 ± 6.66 and 381 ± 6.47 mL/100 g pork and shark, respectively), pork samples had significantly higher ($P < 0.001$) emulsion capacity than shark, even more when treated with a bacterial protease (Fig. 6A). Addition of the bacterial protease considerably reduced shark emulsion capacity and stability, also due to excessive proteolysis. Temperature and animal species were also significant in emulsion capacity in both animal species ($P < 0.001$).

Although partial protein unfolding is necessary to the formation of an interfacial film stabilizing the emulsion, particularly when high molecular weight proteins are involved, excessive protein depletion decreases emulsion stability (Gordon & Barbut, 1992). In our study, emulsion capacity increased at day 5 due to protein unfolding; however, continued enzymatic activity produced excessive protein degradation and, consequently, a decrease in emulsion capacity after day 5. This fact was also observed in shark samples, where endogenous enzymatic activity was significantly higher than in pork (Fig. 1); hence emulsifying capacity and emulsion stability were lower. Conversely as with apparent viscosity (Fig. 4), the effect of the added bacterial protease to pork samples favored emulsion capacity and stability (Fig. 6); conversely, the treatment with the bacterial protease reduced both parameters in shark samples, probably as consequence of excessive proteolysis.

SDS-PAGE (Fig. 3) showed that the higher the myosin concentration, estimated from the protein band densitograms (data not shown) in both extracts, the higher the emulsifying capacity (Fig. 6A). Myosin isolated from white chicken muscle has 3 isoenzymes, whereas the cardiac muscle of the same species has 2 isoenzymes (Nakai & Li-Chan,

1988); the cardiac muscle has better water holding and emulsifying capacity than the white muscle (Smith, 1988). Higher proteolytic activity (Fig. 1) and protein degradation (Fig. 3) in shark was therefore correlated to lower viscosity (Fig. 5) and emulsifying capacity and stability (Fig. 6).

The increase in number and intensity of low molecular weight protein bands in pork and shark SDS-PAGE samples throughout the study time, especially at 15 days of storage (Fig. 3), was correlated to a steady decrease in emulsion stability (Fig. 6B), although no significant difference was observed between animal species ($P > 0.01$). Storage time was the only factor significantly affecting emulsion stability ($P < 0.001$). The decreasing trend in emulsifying capacity was observed in proteins from other animal species, due to myosin degradation and the presence of isoenzymes (Jiménez-Colmenero & Borderías, 1983; Smith, 1988).

Once the protein is altered by environmental conditions such as pH, ionic strength and temperature, among other factors, it loses the emulsifying and emulsion stability capacity. In the case of our study, protease activity was the destabilizing factor; calpains have been reported being high specific, attacking mainly the z-disk structure. Alanís et al. (1999) found the presence of a very active protease of 46.1 kDa in *P. fluorescens* enzymatic extract and the specific degradation of actin. On the other hand, cathepsins also account for myofibrillar protein degradation. Emulsion stability is also related to the tensoactive effect of proteins, and surface charge (Damodaran & Razumovsky, 1998), in our study, treatments with a bacterial protease slight increased ($P > 0.01$) the tensoactive effect presumably by partially unfolding the proteins. However, other factors are also important such as presence of ions, pH and temperature (De Bruijne & Bot, 1999; Kumoski & Farrell, 1994). It is necessary to study protein-fat-interphase interactions, and changes in protein structure subjected to

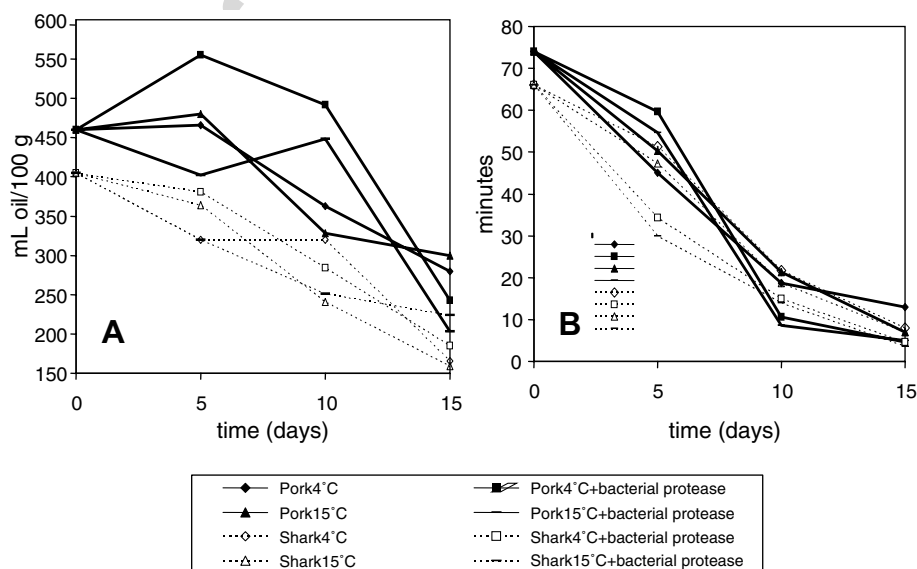


Fig. 6. Emulsifying capacity and stability.

exogenous and endogenous proteases to conclude the emulsion formation mechanism.

4. Conclusions

Although three proteases were found in pork extracts and two in shark meat, high proteolytic activity in shark meat accounted for more severe myofibrillar protein degradation as compared to pork. Endogenous and exogenous proteases depleted high molecular weight myofibrillar proteins (>200 kDa) to lower molecular weight compounds in pork and shark, but excessive proteolysis in shark meat produced lower viscosity values. However, viscosity increased throughout the study time in both animal species, probably due to protein unfolding, protein–protein interaction, aggregation of myosin isoforms and formation of sulfide bonds. Temperature, but not bacterial protease addition, significantly affected the viscosity in both animal species. Although exogenous proteases increased emulsion stability and capacity in pork samples, the viscosity rise was mainly due to higher temperature (15 °C) that promoted higher endogenous and exogenous enzymatic activity. Conversely, excessive proteolysis of shark meat resulted in lower viscosity and less table emulsions.

Acknowledgements

Author García Barrientos thanks the National Council for Science and Technology (CONACYT), Mexico and Universidad Autónoma Metropolitana for a graduate scholarship.

References

- Alanís, E., Lara, P., & Guerrero Legarreta, I. (1999). Proteolytic activity of four strains of *Pseudomonas* sp. on crude extracts of contractile proteins. *Food Chemistry*, 67, 45–51.
- Borderías, A. J., Lamua, M., & Tejada, M. (1983). Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. *Journal of Food Technology*, 18, 85–95.
- Chen, C. S., Hwang, D. C., & Jiang, S. T. (1989). Effect of storage temperature on the formation of disulfide bonds and denaturation of milkfish (*Chanos chanos*) myosin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 37, 1228–1231.
- Cofrades, S., Bañon, S., Carballo, J., & Jiménez-Colmenero, F. J. (2003). Role of cathepsin D activity in gelation of chicken meat heated under pressure. *Food Chemistry*, 80, 241–247.
- Cofrades, S., Carballo, J., Carenche, M., & Jiménez-Colmenero, F. J. (1996). Emulsifying properties of actomyosin from several species. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 29, 379–383.
- Damodaran, S., & Razumovsky, L. (1998). Molecular basis of surface activity of proteins. In J. R. Whitaker, F. Shahidi, A. López Munguia, R. Y. Yada, & G. Fuller (Eds.), *Functional properties of protein and lipids* (pp. 2–18). Washington, DC: ACS Symposium Series.
- De Bruijne, D. W., & Bot, A. (1999). Fabricated fat-based foods. In A. J. Rosenthal (Ed.), *Food texture measurement and perception* (pp. 185–227). Gaithersburg, MA: Aspen Publishers.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Fritz, J. D., & Greaser, M. L. (1991). Changes in titin and nebulin in post-mortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, Western blotting and immunofluorescence microscopy. *Journal of Food Science*, 56, 607–615.
- García, C. F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F. (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 65–69.
- Gordon, A., & Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batters stabilization: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(4), 299–332.
- Guerrero Legarreta, I., Mendiola, R., Ponce, E., & Prado, A. (1995). Inoculation of lactic acid bacteria on pork and beef surfaces as a means of decontamination in semitropical conditions. *Meat Science*, 40(3), 397–411.
- Ilian, M. A., Bickerstaffe, R., & Greaser, M. L. (2003). Postmortem changes in myofibrillar-bound calpain 3 revealed by immunofluorescence microscopy. *Meat Science*, 66, 231–240.
- Jiménez-Colmenero, F. J., & Borderías, A. J. (1983). A study of the effect of frozen storage on certain functional properties of meat and fish protein. *Journal of Food Technology*, 18, 731–737.
- Koohmaraie, M. (1992). Role of the neutral proteinases in postmortem muscle protein degradation and meat tenderness. *Reciprocal Meat Conference*, 45, 63–71.
- Kumoski, T. E., & Farrell, H. M. (1994). Solubility of protein–protein–salt–water interactions. In N. Hetterachchy & G. R. Ziegler (Eds.), *Protein functionality in food systems*. New York: Marcel Dekker.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *Journal of General Physiology*, 30, 291–310.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680–685.
- Li-Chan, E., Nakai, S., & Wood, D. F. (1985). Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. *Journal of Food Science*, 50(4), 1034–1040.
- Liu, M. N., Foegeding, E. A., Wang, S. F., Smith, D. M., & Davidian, M. (1996). Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44(6), 1435–1440.
- MacClemens, D. J. (1999). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Martin, S. A. M., Cash, P., Blamey, S., & Houlihan, D. F. (2001). Proteome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver proteins during short term starvation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 259–270.
- Martínez, I., Ofstaaad, R., & Olsen, R. L. (1990). Myosin isoforms in red and white muscle of some marine teleost fishes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 11(6), 489–495.
- Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Jia, Z., Elce, J. S., & Davies, P. L. (2001). Ca²⁺-induced structural changes in rat m-calpain revealed by partial proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1545, 245–254.
- Naguib, K., Ayesb, A. M., & Shalaby, A. R. (1995). Studies of determination of biogenic amines in foods. 1. Development of the TLC method for determination of eight biogenic amines in fish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 134–139.
- Nakai, S., & Li-Chan, E. (1988). *Hydrophobicity interaction in food systems*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R., & Haisman, D. (1992). Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-gluconolactone. In *38th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 1095–1098). Clermont-Ferrand, France.
- Ouali, A., & Valin, C. (1980). Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase on myofibrillar ATPase activity: relationship with ageing changes. *Meat Science*, 5, 233–245.
- Pérez, M. L., Escalona, H., & Guerrero Legarreta, I. (1998). Effect of calcium chloride marination on enzymatic activity and some quality characteristics of meat from four animal species. *Meat Science*, 48, 125–134.
- Porzio, M. A., & Pearson, A. M. (1975). Isolation of an extracellular neutral proteinase from *Pseudomonas fragi*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 384, 235–242.

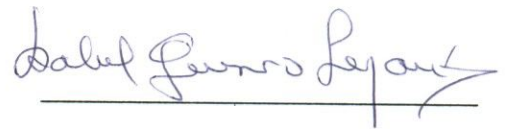
- Porzio, M. A., & Pearson, A. M. (1980). Degradation of myofibrils and formation of premeromyosin by a neutral protease produced by *Pseudomonas fragi*. *Food Chemistry*, 5(3), 195–199.
- SAS Institute (1996). *SAS User's Guide*. Cary, North Carolina.
- Smith, D. M. (1988). Meat proteins: functional properties in comminute meat products. *Food Technology*, 42(5), 116–121.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press.
- Steel, R. G., & Torrie, J. H. (1988). *Bioestadística: principios y procedimientos* (2nd ed.). Bogotá, Colombia: McGraw-Hill.
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L., De Smet, S., & Demeyer, D. (1997). Early post-mortem conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscle beef. *Meat Science*, 45, 307–319.
- Swift, C. E., Lockett, C., & Fryar, A. J. (1961). Comminuted meat emulsion: the capacity of meats for emulsifying fats. *Food Technology*, 15(11), 468–471.
- Taylor, R. G., & Goll, D. E. (1995). Enzyme localization during postmortem muscle tenderization. *Meat Science*, 347–358.
- Turk, V., Turk, B., & Turk, D. (2001). The lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 20(17), 4629–4633.
- Venugopal, V. (1990). Extracellular proteases of contaminant bacteria in fish spoilage: a review. *Journal of Food Protection*, 51(4), 341–350.
- Visessanguan, W., & An, H. (2000). Effects of proteolysis and mechanisms of gel weakening in heat-induced gelation of fish myosin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(4), 1024–1032.
- Whiting, R. C. (1988). Ingredients and processing factors that control muscle protein functionality. *Food Technology*, 42(5), 104, 110–114, 210.
- Wilding, P., Lillford, P. J., & Regensteijn, J. M. (1984). Functional properties of proteins in foods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B, 182–189.

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

Raquel García Barrientos

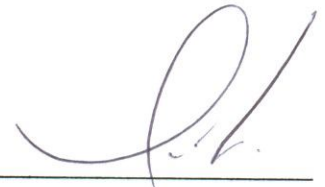
El día 20 de Julio del 2007

Dra Isabel Guerrero Legarreta
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)
Directora



Jurado

Dra. María Lourdes Pérez Chabela
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)
Asesora



Dr. Gerardo Montejano Gaitán
(Instituto Tecnológico de Monterrey, Campus Querétaro)
Asesor

Dra Araceli Tomasini
(Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa)



Dr. Alfonso Totosaus Sánchez
(Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec)

