



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CBS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA DEL MANTO DEL CALAMAR
GIGANTE (*Dosidicus gigas*)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.

SEPTIEMBRE DEL 2001

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. Quintana', written in a cursive style.

“ El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrado de excelencia del CONACyT, y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**”

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

Octavio Dublán García

El día 17 de septiembre del 2001

Jurado:

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira



Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta

Asesor: Dra. Ma. de Lourdes Pérez Chabela

Sinodal: M. en C. Raúl Aguilar Caballero

Sinodal: Dr. José Luis Arredondo Figueroa

Sinodal: Dr. Ramón Cruz Camarillo

Agradecimientos

A Dios, por permitirme seguir adelante y concluir ésta y otras metas.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa por haberme permitido continuar con mis estudios, así como también agradezco al CONACyT por el apoyo económico para poder desarrollar este trabajo.

A las Dras. Isabel Guerrero y Lulú Pérez, por su gran ayuda durante esta etapa de mi vida, así como por sus valiosos consejos durante la escritura de este trabajo.

A la Dra. Edith Ponce, que gracias a sus consejos, paciencia, confianza y apoyo se llevó a cabo la realización del presente trabajo. Gracias por su amistad, y por haber creído en mi.

Al Dr. José D. Sepúlveda, por su valiosa ayuda en la parte de microscopía electrónica de barrido.

Un especial agradecimiento a mis compañeros y amigos de laboratorio, Yoyi, Raquel, Marcelo, Ernesto, Silvia, Cuauhtemoc, Hugo, Keiko, Roberto, Julio, Cony, Sandy y Ruth, por compartir esos momentos tan especiales, por su apoyo y su amistad incondicional, gracias a todos ustedes porque de alguna manera hicieron posible la culminación de este trabajo.

U.C.
20160311

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mis padres, quienes han estado junto a mí en todo momento, apoyándome y dándome fuerzas para seguir adelante. También a mis hermanas Lorena, Karen y Erika, por su gran cariño y apoyo incondicional y a mi sobrino Juan Pablo, por la alegría que nos proporciona. Siempre estarán en mi corazón.

A Hugo Herrera y Misael Martínez, por mostrarme lo mejor de la vida con su gran amistad y apoyo en momentos difíciles, los aprecio mucho.

A Baciliza, por ser una excelente y gran compañera pero sobre todo una gran amiga.

A los escolapios, Ale, Estelita, Gina, Yadis, Andrés, Edgar, Pina, Tere,... quienes han sido mis amigos y parte de mi vida

A Héctor, Xochitl y Ma. Elena, por su gran amistad, siempre estarán presentes.

Con cariño y gran respeto a todos ustedes

Octavio

Todo hombre debe decidir
una vez en su vida
si se lanza a triunfar
arriesgándolo todo,
o se sienta en su balcón
tranquilamente a contemplar
el desfile de los triunfadores.

Anónimo

ÍNDICE

ÍNDICE

	Pag.
Agradecimientos y dedicatorias.....	<i>i</i>
Índice.....	<i>iii</i>
Lista de figuras.....	<i>ix</i>
Lista de tablas.....	<i>xii</i>
1. Resumen y Abstract.....	<i>xiv</i>
2. Introducción.....	<i>xix</i>
3. Revisión Bibliográfica.....	<i>1</i>
3.1 Moluscos de importancia económica en México.....	<i>1</i>
3.1.1 Generalidades de los moluscos.....	<i>4</i>
3.1.2 Generalidades del calamar gigante.....	<i>5</i>
3.1.3 Composición del tejido muscular del calamar.....	<i>9</i>
3.1.4 Estructura del músculo en productos marinos.....	<i>10</i>
3.2 Clasificación de las proteínas musculares.....	<i>13</i>
3.2.1 Proteínas miofibrilares.....	<i>14</i>
3.2.1.1 Proteínas contráctiles.....	<i>15</i>
Evaluación de la actividad proteolítica del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	<i>iii</i>

3.2.1.2 Proteínas reguladoras.....	15
3.2.1.2.1 Proteínas reguladoras mayores.....	16
3.2.1.2.2 Proteínas reguladoras menores.....	16
3.2.1.3 Proteínas del citoesqueleto o filamentos intermediarios...	17
3.2.2 proteínas del tejido conectivo.....	21
3.3 Propiedades funcionales de las proteínas cárnicas.....	22
3.3.1 Capacidad de gelificación.....	23
3.3.2 Capacidad de emulsión.....	24
3.3.3 Capacidad de retención de agua (CRA).....	25
3.3.3.1 Factores que afectan la CRA de la carne.....	25
3.3.3.2 Influencia del pH.....	27
3.4 Parámetros de calidad del tejido muscular.....	28
3.4.1 Textura.....	28
3.4.2 Color.....	30
3.5 Enzimas proteolíticas presentes en tejido muscular.....	31
3.5.1 Calpainas.....	33
3.5.2 Catepsinas.....	35
3.5.3 Acción de proteasas sobre la estructura miofibrilar.....	36
3.5.3.1 Efecto de calpainas sobre la estructura miofibrilar.....	36

3.5.3.2 Efecto sobre la miosina y actina.....	37
3.5.3.3 Efecto sobre proteínas reguladoras.....	37
3.5.3.4 Efecto sobre filamentos intermedarios.....	38
3.5.3.5 Efecto de catepsinas sobre la fracción muscular.....	39
3.5.4 Actividad proteolítica en el músculo de productos marinos.....	40
3.5.5 Acción de proteasas endógenas sobre el músculo después de la muerte del animal.....	41
3.5.5.1 Degradación de los compuestos nitrogenados.....	43
3.5.5.1.1 Nitrógeno proteico.....	44
3.5.5.1.2 Nitrógeno no proteico.....	45
3.6 Inhibidores.....	47
4. Objetivos.....	50
5. Metodología.....	51
5.1 Caracterización parcial de proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	52
5.1.1 Obtención del extracto enzimático del manto del calamar.....	52
5.1.2 Actividad proteolítica del extracto enzimático del manto del calamar.....	52
5.1.2.1 Determinación de la actividad proteolítica con respecto a la temperatura y al pH.....	53
5.1.2.1.1 Actividad en función del pH.....	53

5.1.2.1.2 Actividad en función de la temperatura.....	54
5.1.3 Determinación de proteína.....	54
5.1.4 Efecto de adición de inhibidores proteolíticos.....	54
5.1.5 Purificación parcial del extracto enzimático del manto del calamar gigante.....	55
5.1.6 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteasas en el extracto crudo del manto del calamar.....	56
5.1.6.1 Electroforesis desnaturalizante.....	56
5.2 Evaluación de la actividad proteolítica durante el almacenamiento del homogeneizado del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)...	58
5.2.1 Actividad proteolítica del homogeneizado del manto del calamar gigante.....	59
5.2.2 Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica.....	59
5.2.3 Adición de inhibidores sobre la actividad proteolítica.....	60
5.2.3.1 Perfil de pesos moleculares de proteínas miofibrilares del homogeneizado del manto del calamar gigante.....	60
5.2.4 Cambios de los parámetros de calidad del manto del calamar durante el almacenamiento.....	60
5.2.4.1 Color.....	61
5.2.4.2 Textura.....	61
5.2.4.3 Capacidad de retención de agua.....	62
5.2.4.4 pH.....	62

5.2.5 Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	63
5.2.6 Análisis estadísticos.....	65
6. Resultados y discusión.....	66
6.1 Caracterización del extracto crudo del manto del calamar.....	66
6.1.1 Actividad en función del pH.....	66
6.1.2 Actividad en función de la temperatura.....	69
6.1.3 Determinación de pesos moleculares del extracto enzimático del manto del calamar gigante.....	72
6.1.4 Efecto de adición de inhibidores proteolíticos.....	73
6.1.5 Purificación parcial del extracto enzimático crudo del manto del calamar gigante.....	80
6.1.5.1 Determinación del perfil de pesos moleculares del extracto enzimático del manto del calamar gigante.....	82
6.2 Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica.....	86
6.2.1 Efecto inhibidores proteolíticos.....	88
6.2.1.1 Efecto de inhibidores de proteasas sobre el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares.....	90
6.3 Parámetros de calidad.....	91
6.3.1 Color.....	91
6.3.2 Textura.....	93

6.3.3 Capacidad de Retención de Agua.....	97
6.3.4 pH.....	98
6.4. Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	99
7. Conclusiones.....	104
8. Bibliografía.....	107
9. Anexo.....	130

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Producción de calamar gigante en México.....	1
Figura 2. Esquema del Calamar.....	6
Figura 3. Estructura del miotomo de la musculatura de peces óseos.....	11
Figura 4. Representación esquemática del manto del calamar. Cubo ampliado del espesor completo del manto.....	13
Figura 5. Organización del músculo esquelético.....	20
Figura 6 Sarcómero en estado de relajación muscular (I), y en contracción (II).....	26
Figura 7. Influencia del pH sobre la CRA.....	27
Figura 8. Formación de las principales aminas volátiles en productos marinos frescos.	46
Figura 9. Efecto del pH en la actividad proteolítica de las proteasas presentes en el manto del calamar gigante a 35°C.....	66
Figura 10 Efecto de la temperatura en la actividad a pH 2.7 y 3.1.....	70
Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad a pH 6.1, 7.3 y 7.6.....	70
Figura 12.Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 2.7.....	74
Figura 13. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 3.1.....	74
Figura 14. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 6.1.....	75
Figura 15. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 7.3.....	75
Figura 16. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 7.6.....	76
Figura 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a diferentes pH.....	77

Figura 18. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 2.7.....	79
Figura 19. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 3.1.....	80
Figura 20. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 6.1.....	80
Figura 21. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 7.3.....	81
Figura 22. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%.....	82
Figura 23. Cromatografía de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 2.7.....	83
Figura 24. Cromatografía de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 3.1.....	84
Figura 25. Cromatografía de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 6.1.....	84
Figura 26. Cromatografía de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 7.3.....	85
Figura 27. Cromatografía de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 7.6.....	85
Figura 28. Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica.....	87
Figura 29. PAGE-SDS de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), diferentes días de almacenamiento.....	88
Figura 30. Efecto de inhibidores sobre actividad proteolítica del homogeneizado de músculo de calamar (día cero).....	89
Figura 31. Efecto de inhibidores sobre actividad proteolítica del homogeneizado de músculo de calamar (día tres).....	89

Figura 32. PAGE-SDS del efecto de inhibidores de proteasas sobre el perfil de proteínas miofibrilares del homogeneizado del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), teñido con azul de coomasie.....	90
Figura 33. Cambios en el esfuerzo al corte del manto crudo y cocido del calamar gigante almacenado a los 0, 2, 4, 6 y 8 días.....	94
Figura 34. Efecto del almacenamiento sobre la CRA del manto del calamar gigante.....	97
Figura 35. Efecto del almacenamiento en el pH del manto del calamar gigante.....	98
Figura 36. SEM del manto del calmar gigante al inicio del estudio.....	100
Figura 37. SEM del manto del calmar gigante al inicio del estudio.....	100
Figura 38. SEM del manto del calmar gigante almacenado a 4°C durante 5 días.	101
Figura 39. SEM del manto del calmar gigante almacenado a 4°C durante 9 días.	101
Figura 40. Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína.....	131
Figura 41. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%.....	137
Figura 42. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%.....	138
Figura 43. Tipo de instrumental de prueba utilizados en la evaluación de la textura. Navaja Warner-Bratzler para prueba de esfuerzo al corte.....	143
Figura 44. Esquema de la curva de Warner-Bratzler para una muestra del músculo de calamar.....	144

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Proteínas en el tejido muscular de carnes rojas.....	19
Tabla 2. Propiedades funcionales de las proteasas endógenas.....	40
Tabla 3. Inhibidores de proteasas más comunes.....	47
Tabla 4. Enzimas proteolíticas presentes en el tejido muscular.....	48
Tabla 5 Inhibidores proteolíticos utilizados.....	55
Tabla 6. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la actividad proteolítica (pH's ácidos).....	67
Tabla 7. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la actividad proteolítica (pH's neutros).....	67
Tabla 8. Comparación del pH óptimo de actividad del extracto crudo del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) a 35°C.....	69
Tabla 9. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (pH's ácidos).....	71
Tabla 10. Pesos moleculares calculados del extracto crudo del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	73
Tabla 11. Comparación de medias por el método de Duncan del efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.....	77
Tabla 12. Comparación de medias de la luminosidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15, por el método de Duncan.....	92
Tabla 13. Comparación de medias de la cromaticidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15, por el método de Duncan.....	92
Tabla 14. Comparación de medias de la tonalidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15, por el método de Duncan.....	92
Tabla 15. Comparación de medias por el método de Duncan sobre el esfuerzo al corte del manto del calamar crudo, almacenado a los días 0, 4, 6 y 8.....	96

Tabla 16. Comparación de medias por el método de Duncan sobre el esfuerzo al corte del manto del calamar cocido, almacenado a los días 0, 4, 6 y 8.....	96
Tabla 17. Pesos moleculares de las fracciones 1 a 7 del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	137
Tabla 18. Pesos moleculares de las fracciones 8 a 14 del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	138
Tabla 19. Pesos moleculares de las fracciones 15 a 21 del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	139
Tabla 20. Perfil de pesos moleculares de las distintas fracciones obtenidas por intercambio catiónico (Fracciones 1-6).....	140
Tabla 21. Perfil de pesos moleculares de las distintas fracciones obtenidas por intercambio catiónico (Fracciones 7-12).....	140
Tabla 22. Efecto de los diferentes inhibidores a los tres días de almacenamiento.....	141
Tabla 23. Marcadores utilizados.....	143
Tabla 24. Análisis de varianza.....	144

RESUMEN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un cefalópodo encontrado en abundancia en los litorales de México. El consumo de este molusco en forma fresca es muy bajo, debido a que la población mexicana no está acostumbrada a consumir este producto por ser poco conocido comercialmente, además por presentar un aspecto poco agradable. Aproximadamente el 80 % del volumen de captura es exportado a España y Corea, en donde su consumo es muy elevado. Sin embargo cuando el calamar llega a su destino, presenta cierto estado de degradación probablemente ocasionado por la intensa actividad proteolítica en el manto.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa, y se realizó en dos partes.

Primero se caracterizaron parcialmente las proteasas presentes en esta especie. Se determinó el pH y la temperatura de actividad óptima utilizando como sustratos hemoglobina y caseína, y se calculó el perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto enzimático. La actividad proteolítica en el extracto del manto del calamar gigante, fue máxima a 35 °C, se detectaron varios picos de actividad en el intervalo de pH estudiado (2.7, 3.1, 6.1, 7.3 y 7.6). El peso molecular de proteínas y péptidos encontrados en el extracto fue en un intervalo de 11,000 a 395,000 Da.

Se determinó el tipo de enzimas que podrían estar presentes en el músculo del calamar, mediante la adición de varios inhibidores de proteasas. Se observó que la actividad proteolítica fue inhibida por leupetina A, quimostatina, pepstatina e inhibidor de tripsina, principalmente, y en menor medida por pirofosfato, EDTA, iodoacetamida, CaCl₂ y PMSF, lo cual podría dar un indicio de la presencia de diversas enzimas tales como serin, cistein, aspártico y metalo-

proteasas que son algunas de las proteasas implicadas en el deterioro de la textura y color de los productos marinos.

En la segunda parte de este trabajo se observó la acción de proteasas sobre el músculo durante el almacenamiento en refrigeración. Evaluando algunos parámetros de calidad asociados a la integridad de proteínas musculares como textura, color, capacidad de retención de agua y pH, así como cambios de la estructura del músculo del calamar mediante la observación por microscopía electrónica de barrido, todo esto durante un periodo de almacenamiento en refrigeración.

La fuerza al corte disminuyó significativamente durante los 8 días de almacenamiento, debido a la autólisis sufrida por la acción de las proteasas endógenas presentes en el músculo. El pH y la CRA se incrementaron durante el tiempo de estudio, debido principalmente a la aparición de grupos amino provenientes de la formación de dimetilamina y posible degradación de proteínas. El color varió durante el almacenamiento, esto podría ser debido a la autólisis de los complejos pigmento-proteína responsables del color del tejido muscular. Finalmente, la microscopía electrónica de barrido, mostró la degradación de colágeno, aparición de espacios entre las células musculares y deformación de fibras musculares.

En este trabajo se demostró que la calidad del manto del calamar gigante es alterada por las enzimas proteolíticas presentes en éste, y debido a que algunos de los inhibidores utilizados no se permiten por la legislación alimentaria, se recomienda para trabajos posteriores, utilizar métodos alternos para llevar a cabo la inactivación de las enzimas, como control del pH y temperatura, así como la utilización de altas presiones, procurando no afectar

tanto sus características organolépticas como las de calidad. Asimismo es necesario llevar a cabo estudios más específicos sobre actividad de las colagenasas, ya que son una de las responsables en la degradación del colágeno dando como resultado el ablandamiento del músculo del calamar durante el almacenamiento.

ABSTRACT

Giant squid is one of the main species captured off the pacific coast of Mexico. Although it is an excellent source of protein, it is not widely consumed due to their characteristic flavor and low functionality. The last as a result of an intense endogenous proteolytic activity, that is more evident after death and leads to a rapid muscle autolysis during storage with the consequently lost in texture and functionality. However, few reports were found in the literature regarding to specific enzymes present in this mollusk. Therefore the main objective was to characterize the endogenous proteases of giant squid mantle muscle according to their molecular weight profile, pH, temperature and inhibitors response. Also, to evaluate changes associated to proteolysis during chill storage.

This work was developed in the Area of Bioquímica de Macromoléculas, Biotecnología, UAM-Iztapalapa. First, The proteolytic activity of the mantle muscle of giant squid (*Dosidicus gigas*) was characterized for its pH and temperature optima, and response to proteinase inhibitors. Extracts were prepared by homogenization of mantle with phosphate buffer (pH 7, 20 mM), activity was assayed using hemoglobin and casein as substrates. Then, proteases were isolated by sequential ammonium sulfate precipitation, followed by gel filtration or cationic exchange chromatography and SDS-PAGE. High proteolytic activity was detected at 35 °C in both acidic and alkaline pH ranges with optimal activity at the following pH values 2.7, 3.1 6.1 and 7.6. Proteases were strongly inhibited by leupeptin, pepstatin, chymostatin, and trypsin inhibitor although pyrophosphate, EDTA, iodoacetamide, CaCl₂ and PMSF had lower inhibitor response. The molecular weights obtained by SDS-PAGE ranged from 11,000 to 395,000 Da. Therefore,

it was concluded that several enzymes such as acid-, thiol- and serin-proteases may be related to the endogenous squid proteolytic activity.

On a second stage, changes associated to proteolysis of mantle muscle during chill storage were studied. Portions of mantle were vacuum packed and stored at 4°C during eight days. Water holding capacity (WHC), color, pH, shear stress and scanning electronic microscopy analysis were carried out.

WHC and pH increased during storage, but after day 4 these values remained constant. Dissociation of the protein-pigment complex by proteases brought about changes in color. Finally, electron micrographs showed considerable connective tissue degradation and fiber deformation; also, shear stress values decreased throughout the storage. Structural degradation of mantle muscle and high pH values were responsible of the increase in WHC, but lost of textural properties were mainly due to the endogenous protease activity.

Results showed that giant squid mantle is damaged by endogenous proteases and they must be considered in order to prevent protein degradation to increase shelf-life and extend the processing alternatives of this resource.

Some protease inhibitors used in this theses are no allowed by the food legislation therefore, it is advised for future studies to look for alternative methods of enzyme inactivation, as pH and temperature control, as well the use of high pressure. In the same way, it is necessary to make future studies regarding collagen degradation, as it related to mantle softness during storage. Finally, it is recommended to carry out histological studies in order to identify the specific structures that are degraded during storage.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante *Dosidicus gigas* es un recurso altamente migratorio y variable, que se presenta en aguas mexicanas sin una periodicidad bien definida, afectada por fenómenos de gran escala como el Niño. La tasa de crecimiento individual de esta especie es de las más altas; llega a medir 60 cm de longitud de manto al año de edad (SEMARNAP, Instituto Nacional de la Pesca, Carta Nacional Pesquera, 2000).

En México se han detectado hasta ahora las mayores concentraciones frente a Bahía Magdalena y en la boca del Golfo de California prolongándose hasta las Islas Revillagigedo (Secretaría de Pesca, INP, 1992).

Durante el periodo de 1995 a 1999 se han presentado las capturas más altas de esta pesquería, siendo en 1997 la captura record de 120,877 toneladas. Esta pesquería cuenta con un esquema de investigación y manejo bien desarrollado, en el que participan los productores (SEMARNAP, Instituto Nacional de la Pesca, Carta Nacional Pesquera, 2000).

Esta especie probablemente bianual que presenta desove seriado y rápido crecimiento, dependiendo esto último de la temperatura del agua y de la disponibilidad de alimento, motivo por el cual los cambios climáticos la impactan severamente (Secretaría de Pesca, INP, 1992).

Después de la captura y muerte del calamar, éste sufre inmediatamente un deterioro, la velocidad de degradación es más elevada que la de otros tipos de tejido muscular. Este proceso de degradación es llevado a cabo en una primera etapa, por las propias proteasas musculares y posteriormente por enzimas producidas por los microorganismos que ingresan al músculo.

Los procesos de deterioro se ven favorecidos por las siguientes causas (Carballo y López, 1991; Oliveira, 1998):

- Al morir el organismo marino, hay pérdida de la estabilidad de las membranas celulares, liberándose enzimas de los lisosomas.
- Los mecanismos de defensa cesan, posibilitando la invasión de microorganismos desde la piel y vísceras.
- Al capturar un organismo marino, se le cambia del medio natural y por lo tanto su flora microbiana normal también va a variar.
- Esta microflora normalmente es psicrótrofa, pero después de la captura se le suma una flora microbiana fundamentalmente mesófila debida a la manipulación.

Algunos tipos de calamar tienen enzimas con elevada actividad proteolítica en su manto. Rodger y col. (1984), demostraron que distintas proteasas en el manto del calamar causan la degradación de la miosina y sugirieron que la proteólisis puede influenciar la textura durante el almacenamiento y cocción de la carne del calamar.

La velocidad de deterioro varía según las especies dependiendo de diversos factores, tales como tamaño, estado fisiológico, alimentación, métodos de captura y temperatura, entre otros.

Los cambios bioquímicos dan lugar a diferentes etapas de deterioro y por consiguiente diferentes grados de frescura, que son de importancia para la determinación de la calidad del calamar cuando se le utiliza como materia prima en la elaboración de productos procesados o para consumo humano directo.

En la industria alimentaria, los atributos de calidad de la materia prima de la cual se parte y que se someterá a un proceso tecnológico es de vital importancia. Sabido es, que para obtener un producto final de buenas características, es necesario partir de una materia prima de buena calidad.

Por lo cual la proteólisis es el mayor problema tanto en la purificación de proteínas (Murray, 1990), como en la alteración de la textura de carnes rojas, pescados y moluscos durante su almacenamiento (Jiang y Lee, 1985, Ebina y col., 1995).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Molusco de importancia económica en México

En México el recurso calamar está compuesto de varias especies de los géneros *Loligo*, *Lolliguncula*, *Loliolopsis*, *Illex*, *Ommastrephes* y *Symplectoteuthis*; la mayoría se pesca en forma incidental, sin embargo, el calamar gigante *Dosidicus gigas* es actualmente la única especie de calamar que constituye una pesquería con un grado de desarrollo importante en el Pacífico norte de México.

En 1995 y 1996, la producción pesquera de calamar gigante en Baja California Sur, constituyó el 21.3% y 36.4% y en Sonora el 3.8% y 13% respectivamente. En el mismo periodo, las capturas de ambos estados ascendieron de 33,726 toneladas a 97,361 toneladas de peso de manto, el 2,8% y 5,4% de la producción pesquera nacional de los mismos años. Durante 1997 se capturaron 120,877 toneladas de calamar gigante, lo que es el máximo histórico de captura (cifras preliminares de la SEMARNAP Instituto Nacional de la Pesca, 1997-1998). En la figura 1 se muestra la producción del calamar gigante en México.

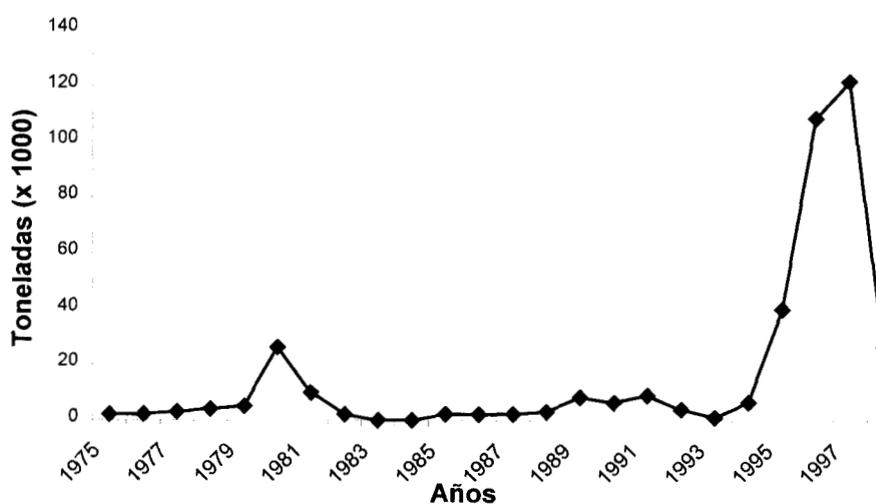


Figura 1. Producción del calamar gigante en México (Carta Nacional Pesquera, INP, 2000).

La importancia de este recurso en nuestro país es regional, principalmente en el Golfo de California. Los principales estados productores son Sonora y Baja California Sur.

Los ingresos en divisas de calamar en México en los últimos años fueron del orden de 140 mil dólares por exportación de 121 toneladas en 1994, 2.22 mdd por 2,341 toneladas en 1995 y 17,84 mdd por 19,233 toneladas en 1996 (SEMARNAP, 1997).

El mercado nacional e internacional está sujeto a la demanda. Los principales países que compran calamar gigante a México son, Corea del Norte, Japón, Corea del Sur, Hong Kong, Estados Unidos, Chile y España. Para el mercado nacional se presenta en filete congelado, filete precocido, precongelado con sal, precocido con azúcar, con ambos o con otros sazonadores.

La pesca del calamar gigante en el Golfo de California, empezó en 1974, con la operación de una pequeña flota artesanal, la cual pescaba de dos a tres meses durante el verano, cuando el stock se encontraba cerca de la costa. La producción era muy poca y la captura consumida localmente (Ehrhardt y col. 1982).

A partir de 1978, con la presencia de altas concentraciones de calamar, una parte de la flota camaronera se incorporó a esta pesquería, de manera complementaria a la del camarón en los meses de verano; iniciándose el primer periodo de máximas capturas y la confirmación de una flota que explotó a gran escala esta especie de 1979 a 1981.

Durante este lapso se incorporaron alrededor de 285 embarcaciones nacionales de características variables, 15 barcos calamareros japoneses operando a través de empresas de coinversión de capital mexicano-japonés y con ellos nuevas tecnologías que incidieron en el mejoramiento y eficiencia en la captura del calamar, y la flota menor compuesta por pangas de pesca ribereña. En 1981 la pesquería se mantuvo mientras el recurso se encontraba dentro del

Golfo de California y posteriormente solo los barcos de las empresas de coinversión siguieron el recurso en su migración fuera del Golfo de California, pescándose en la zona de Cabo San Lucas, B.C.S., costas de Nayarit y Colima.

En el periodo de 1983 a 1987 la escasez del recurso en las áreas de pesca disminuyó notablemente, la pesquería casi desapareció presentándose solamente capturas esporádicas a lo largo del año.

De 1989 a 1992 se inició nuevamente una pesquería comercial en la que participaron seis embarcaciones calamareras japonesas, controladas por empresas mexicanas, operando en la costa occidental de la Península de Baja California y alrededor de las Islas Revillagigedo, además de tres embarcaciones camaroneras adaptadas a la pesca de calamar operando dentro del Golfo de California.

En 1994 se inicia un nuevo periodo en esta pesquería dentro del Golfo de California lo que reactivó la flota nacional (pangas y barcos camaroneros adaptados), conforme el recurso fue incrementando su presencia en las áreas de pesca, alcanzando una captura de 97 mil toneladas de peso de manto en 1996. En este año para embarcaciones mayores se autorizaron 150 permisos en el estado de Sonora y uno en el estado de Baja California Sur, mientras que para embarcaciones menores (pangas con motor fuera de borda), los permisos autorizados amparan 646 en el estado de Sonora y 342 en el de Baja California Sur (Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo. INP, 1997-1998).

3.1.1. Generalidades de los moluscos

Los moluscos son animales que poseen cuerpo blando, con cabeza anterior, pie ventral y masa visceral, un gran número de éstos contiene una concha de carbonato de calcio. La mayoría son de vida libre, de tamaños muy variados y sobresalen por su talla los calamares que llegan a medir hasta diecinueve metros de longitud y habitan en las grandes profundidades, así como los pulpos gigantes, y entre los bivalvos, *Tridacna*, la almeja gigante del Pacífico Sur.

El nombre de molusco (*Moll*, *Mollis* o *Molacos*) significa blando y es la característica común entre estos seres, y en su disposición orgánica se distingue lo siguiente (Vargas, 1980):

- a) Un saco visceral, en el que como su nombre indica, están incluidas todas las vísceras.
- b) Un manto, que es la disposición de una doble capa cutánea del saco visceral.
- c) Una cabeza, que puede estar presente o no, como sucede en los *Lamelibranchios* (almejas y ostras), o bien puede estar circundada de tentáculos como sucede en los cefalópodos (jaiba, calamar y pulpo común).
- d) Una concha, que no está presente en todas las especies.

3.1.2. Generalidades del calamar gigante

El calamar se clasifican de la siguiente manera (Burton y Burton, 1979; Vargas, 1980):

Tipo	Moluscos
Nombre	<i>Dosidicus gigas</i>
Sinonimia objetiva	<i>Ommastrephes gigas</i> , <i>O. Gaganteus</i> , <i>Dosidicus eschirichii</i> , <i>Dosidicus steenstrupii</i>
Clase	Cefalópodos
Subclase	Coleoidea
Orden	Dibranquios
Suborden	Decápodos
Familias	<i>Arquitéutidos</i> <i>Histiotéutidos</i> <i>Quirotéutidos</i> <i>Ommastrephidae</i>
Subfamilia	<i>Ommastrephidae</i>
Especies	<i>Alloteuthis media</i> <i>Dosidicus gigas</i> <i>Illex argentinus</i> <i>Lóligo vulgaris</i> <i>L.forbesi</i> <i>Ommatostrephes sagittatus</i> <i>O. Sloani pacificus</i> <i>Todarodes pacificus</i>

Su cuerpo es alargado, delgado, cilíndrico, opalescente, provisto de un par de aletas de forma romboidal que parte del extremo posterior que llegan hasta la mitad o más del cuerpo.

Su color es cambiante a causa de la existencia de cromatóforos. Poseen diez tentáculos, de los

cuales dos son más largos que los demás y reciben el nombre de brazos tentaculares, éstos poseen en su extremidad cuatro o más series de ventosas de diferente tamaño; la longitud de estos brazos tentaculares es de aproximadamente tres veces más que la de los otros tentáculos menores. En la Figura 2 se muestra un esquema del calamar.

La concha es tierna, conocida como pluma del calamar. El nombre del calamar se debe a la coexistencia de la pluma y la bolsa de tinta, que hizo que se le comparara con un tintero antiguo o “calamario”, en donde el recipiente que contiene el líquido estaba acompañado de orificios, donde se disponían los cálamos o vástagos de las plumas de aves, con que antiguamente se escribía (Cendero, 1971; Juárez, 1978).

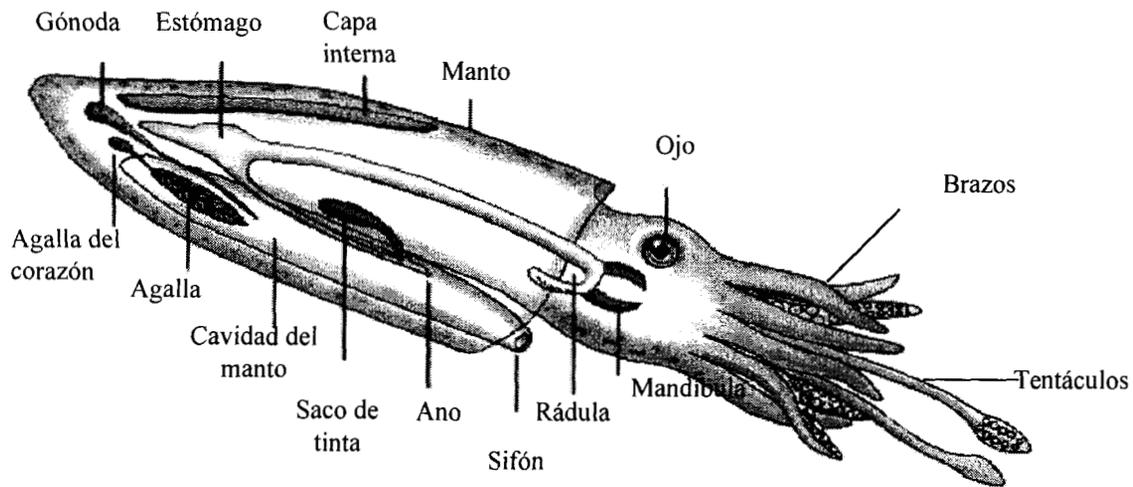


Figura 2. Esquema del calamar

Esta especie se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde la frontera de México y los Estado Unidos hasta Chile. Se encuentra desde la superficie hasta más de 400 metros de

profundidad, asociando sus mayores concentraciones a zonas ricas en nutrientes, que sostienen especies que conforman su dieta básica (Suda, 1973).

Dosidicus gigas tiene un ciclo de vida corto de máximo dos años. Presenta altas tasas de crecimiento, alcanzando tallas de alrededor de los 80 cm de longitud de manto y peso máximo de 9 kg (Ehrhardt y col., 1982). De la Rosa y col., (1992) registraron individuos de una longitud máxima de 97 cm de longitud de manto y peso entero máximo de 37 kg.

El calamar presenta varios tipos de desove pero los más importantes por su magnitud suceden en verano e invierno, aunque parece ser que el ciclo reproductivo de la especie no es un proceso estadístico y definitivo, ya que los cambios de las condiciones oceanográficas en el Golfo de California y aguas del Pacífico tienen gran influencia en la determinación de los picos reproductivos de *Dosidicus gigas* (Ehrhardt y col., 1986).

La talla de primera madurez de las hembras se presenta cuando éstas alcanzan de 35 a 40 cm de longitud de manto, de cuatro a cinco meses de edad; en los machos se observa cuando miden de 18 a 25 cm, tres a cuatro meses de edad (Ehrhardt y col., 1986). Hernández y col. (1996) reportan la talla mínima de madurez a los 25 cm de longitud de manto para las hembras y de 30 cm de longitud de manto para los machos. Mientras que la talla al 50% de reproducción fue de 42.2 y 51.6 cm de longitud de manto para hembras y machos respectivamente.

La fecundidad para esta especie fue calculada por Nesis (1970) para porción sureña del Pacífico (Perú y Chile), para el caso de las hembras la fecundidad varía de 100,000 a 600,000 huevos con máximo de 650,000 huevos en hembras de más de 50 cm de longitud de manto.

Las capturas de calamar han presentado cambios significativos a través del tiempo, ya que como se ha dicho, es un recurso oceánico altamente migratorio que se ha presentado por

pulsos de varios años en las costas mexicanas. Tal es el caso de los periodos 1979-1981, 1988-1992 y el actual iniciado en 1994 con el cual se llegó al máximo histórico en 1997, registrando un total de 120,877 toneladas (Ehrhardt y col., 1986; Secretaría de Pesca 1981-1994; cifras preliminares de la SEMARNAP).

Por otra parte, algunos autores (López, 1984) han observado que la variación estacionaria y su ciclo reproductivo están relacionadas con su naturaleza química e histológica así como en la velocidad de descomposición de la carne del calamar, ya que se ha encontrado que el calamar capturado en verano se deteriora más rápido que el capturado en otoño (Paredi y Crupkin, 1997). Por otro lado, el consumo de este molusco en forma fresca es muy bajo, debido a que la población mexicana no está acostumbrada a consumirlo por ser poco conocido comercialmente y además presenta un aspecto poco agradable.

Las características de la porción comestible del calamar gigante son las siguientes:

- a) textura muy tierna pero elástica.
- b) color blanco cremoso, que se oscurece paulatinamente si no se le maneja de forma adecuada
- c) olor relativamente desagradable.

Tradicionalmente el calamar gigante ha sido consumido en Japón en forma de productos típicos, el más popular es un alimento seco. El procedimiento general para elaborar productos de calamar seco en Japón, consiste en partir y eviscerar el calamar fresco, removiendo el saco de tinta, cartílago y piel y secar el manto y tentáculos. Varios productos que existen se diferencian en sabor, textura y humedad. Algunos productos de este tipo son Chimmi-ika, "Saki-ika" y "Nsh-ika", incluyen botanas muy populares en el Japón (Sikorsky y Pan, 1994).

Las principales diferencias entre el calamar gigante y las otras clases de calamar, son que el primero es de un tamaño grande, sus aletas son muy amplias, y sus ojos son del tipo abierto, por carecer de membrana ocular. El extremo de sus brazos es angosto, cada uno con cien a doscientas ventosas muy pequeñas, y el cuarto brazo izquierdo o derecho funciona a la vez como órgano copulador. Esta especie no presenta ningún tejido u órgano luminoso, y el color de su cuerno es rojizo o rosado. Se le conoce como del tipo oceánico, y sigue un patrón de comportamiento migratorio.

Las longitudes máximas de esta especie varía por regiones. En Ecuador con una longitud promedio de 65 centímetros; para Chile de 93 centímetros y un peso correspondiente de 33 a 35 kilogramos y finalmente en el Golfo de California se reporta una longitud de 83 centímetros y 13.6 kilogramos de peso.

El calamar gigante es normalmente vendido en forma congelada en mantos eviscerados, y es enviado a Europa después de 1 a 3 meses de almacenamiento en congelación, tiempo en el cual es parcialmente degradado (Gómez y col., 1998).

3.1.3. Composición del tejido muscular del calamar

El agua contenida en el manto del calamar va de un 67 hasta un 80%. El contenido de grasa va desde 1 a 1.5%. La cantidad de proteína varía con la época de captura; así las especies capturadas en verano contienen más agua y menos proteína cruda, que el capturado en otoño. El organismo tiene una cantidad de grasa máxima, agua mínima y menos nitrógeno en octubre y noviembre.

Aún en Japón, donde la carne de calamar es ampliamente consumida mucha gente subestima su valor nutritivo y lo consideran casi indigerible. Sin embargo, las investigaciones han mostrado que su patrón de aminoácidos es similar al del pescado, por lo que el calamar es considerado un excelente recurso de proteína comestible.

A pesar de ser un producto rico en proteínas, como todos los cefalópodos, ofrece una capacidad muy pobre de formación del gel, probablemente debida a la intensa actividad proteolítica en el manto, la que degrada a la molécula de miosina durante el almacenamiento o en el calentamiento, disminuyendo su calidad de procesamiento y la vida de anaquel (Gómez y col., 1996).

Existen diferencias considerables en la naturaleza química e histológica de las carnes de pescado y de calamar. En este último, el porcentaje de proteína comestible es cercano al 80%; 50% en el tronco y 30% en los tentáculos, aproximadamente, las proteínas son el segundo componente mayoritario en el músculo, ya que la cantidad de agua contenida en el manto del calamar va de un 67 hasta un 80%. El contenido de grasa va desde 1 a 1.5%.

3.1.4. Estructura del músculo en productos marinos

El músculo esquelético se compone de células (fibras) largas, estrechas, multinucleares, que varían entre unos pocos y muchos centímetros de longitud y de 10 a 100 μm de diámetro.

La organización típica del tejido muscular de los peces óseos presenta segmentos en forma de W que descansan sobre la cola que se denominan miotomos y tienen una curvatura hacia

delante y dos hacia atrás. En la Figura 3 se muestra la estructura del miotomo de la musculatura de peces óseos.

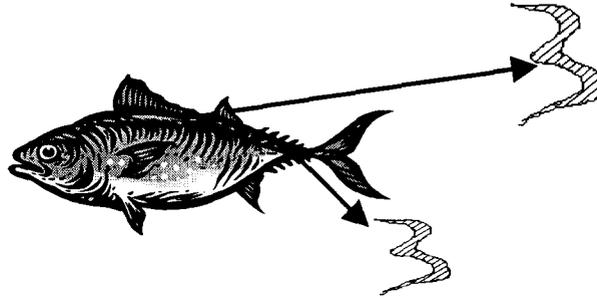


Figura 3. Estructura del miotomo de la musculatura de peces óseos (Hultin, 1993).

Los miotomos no son perpendiculares a la vertical del plano medio del pescado, sino que interceptan de modo típico a este plano en ángulos agudos. Así, si se realiza un corte en ángulo recto con respecto al esqueleto central se afectan múltiples miotomos.

Estos tienen el espesor de una célula, las que son aproximadamente perpendiculares a la superficie del miotomo. Los miotomos están conectados entre sí por capas delgadas de tejido conjuntivo colagenoso denominadas miosepta (miocomatas). En el calamar (lura), el manto (pared externa del cuerpo) está formado por fibras musculares circulares. A intervalos más o menos regulares, éstas fibras se interrumpen por secciones de fibras orientadas radialmente cuya función es “adelgazar” el manto y hacer que la cavidad del mismo se expanda a continuación de cada contracción de las fibras circulares. En algunas especies de calamares, las fibras superficiales también discurren longitudinalmente a lo largo del manto. Las miofibrillas del manto del calamar están unidas helicoidalmente y se designan como estriadas oblicuamente (Hultin, 1993).

El manto del calamar está compuesto de tejido muscular intercalado entre dos tunicas de tejido conectivo. Las fibras musculares están agrupadas en bandas las cuales están ordenadas de manera ortogonal que se pueden clasificar como las fibras circunferenciales que corren dentro del espesor del manto y las fibras radiales es perpendicular a ambas tunicas del tejido conectivo. Todas las fibras musculares son pequeñas células elongadas de miofibrillas alrededor de un núcleo central el cual alberga a las proteínas sarcoplásmicas y mitocondrias. Las fibras del manto del calamar están estriadas oblicuamente y cubiertas con un sarcolema delgado. Las fibras de tejido conectivo están arregladas en un modelo específico en la túnica exterior, pero aparece menos ordenado en la túnica interna. Todas las fibras de tejido conectivo están compuestas de agregados de fibras pequeñas, pero el tamaño y forma difieren en cada túnica. En general, las fibras musculares no corren paralelamente a lo largo del eje del manto del calamar. Las fibras de la colágena también tienen una orientación específica con el mayor número de fibras en la túnica exterior (Kuo y col., 1991). En la figura 4 se muestra un esquema de las tunicas internas y externas están cubiertas por un revestimiento visceral no fibroso, y un revestimiento exterior de fibras orientadas al azar, respectivamente (Otwell y Hamann, 1979).

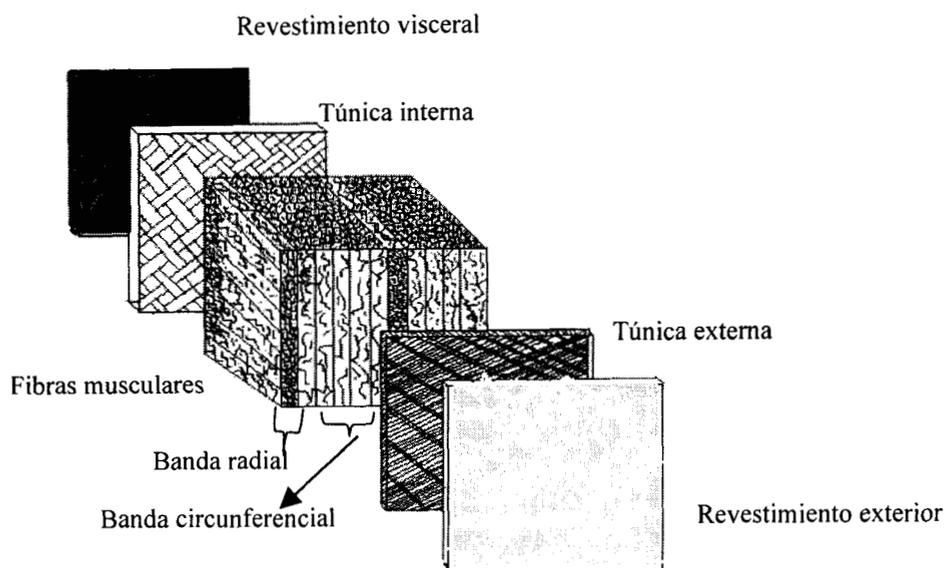


Figura 4. Representación esquemática del manto del calamar. Cubo ampliado del espesor completo del manto (Otwell y Hamann, 1979).

3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUSCULARES

Las proteínas constituyen el componente mayoritario de la materia seca del músculo estriado. Atendiendo a su forma, las proteínas cárnicas se clasifican en globulares y fibrosas. También se pueden clasificar según su localización en el músculo.

La clasificación más aceptada es la que atiende simultáneamente a la solubilidad y la localización de las proteínas cárnicas (Cassens, 1994, Pérez y col., 2000):

- Proteínas insolubles o del estroma: siendo la más importante la colágena. Son insolubles en medio neutro y por sus características en contenido de aminoácidos no

tienen triptófano ni lisina, siendo, pues, de bajo valor biológico. La colágena cuando se calienta a 60 °C se contrae presentando problemas, ya que provoca una exudación y pérdida de textura. Con calentamiento superior a 60°C se transforma en gelatina, de fácil digestión pero que continúa siendo de bajo valor biológico.

- Proteínas solubles en disolución salina concentrada: las miofibrilares (actina, miosina, proteína M) son las más abundantes y responsables de la conversión de energía química en mecánica y de la textura de la carne y las más importantes según sus propiedades funcionales.
- Proteínas solubles en disoluciones salinas diluidas o sarcoplásmicas: sistemas enzimáticos, mioglobina y otros.

3.2.1. Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares se dividen en: contráctiles, reguladoras y los filamentos intermediarios. El descubrimiento de los mecanismos físico-químicos envueltos en la conversión de energía química (ATP) en energía mecánica o trabajo es todavía de gran interés. Se conoce mucho de la química de las más importantes proteínas envueltas en el proceso, aunque quedan algunas incógnitas sobre los eventos que subyacen en la contracción, en la mitigación de ciertas condiciones anormales del músculo, y aún más importantes, en la compresión de los factores responsables de la dureza (Bandman, 1994).

3.2.1.1. Proteínas contráctiles

En este grupo se encuentran la miosina, la actina y la paramiosina, las cuales están directamente relacionadas con el ciclo de la contracción-relajación del músculo.

La miosina es la proteína miofibrilar más abundante, constituye más de una tercera parte de la proteína del músculo, tiene un peso molecular aproximado de 500 kDa y contiene dos cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 220 kDa cada una y cuatro cadenas ligeras de aproximadamente 14 a 20 kDa dependiendo de la especie y tipo de músculo.

La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante comprendiendo un 20% del total, su peso molecular es aproximadamente 42 kDa tiene una estructura globular con menos de un 30% de α -hélice (Price y Schweigert, 1994).

La paramiosina, se encuentra en los músculos de moluscos y otros invertebrados, donde alcanza hasta un 50% del total de las proteínas de sus fibras musculares. Tiene un peso molecular de 95 a 125 kDa y un contenido α -helicoidal próximo al 100%. Forma en estos sistemas el núcleo central de los filamentos gruesos que tienen miosina (Hultin, 1993).

3.2.1.2. Proteínas reguladoras

Estas proteínas juegan un papel muy importante en el ciclo de la contracción-relajación. Se dividen en 2 grupos: las proteínas reguladoras mayores y las reguladoras menores (Lawrie, 1985).

3.2.1.2.1. Proteínas reguladoras mayores

La **tropomiosina** es una molécula α -helicoidal, así llamada por su similar composición aminoacídica con la miosina, consta de dos cadenas de aproximadamente 33 kDa. Hay dos tipos de subunidades, denominadas α y β , ambas cadenas constan de 284 aminoácidos. Las propiedades funcionales de la tropomiosina radica en su unión estequiométrica con la actina (1:7 moléculas) y en su unión a la troponina.

La **troponina** es una proteína de 70 kDa y posee una alta afinidad por el calcio. La troponina se localiza en el filamento fino con una periodicidad de 40 nm y está unida a la tropomiosina. Se cree que consta de tres subunidades separadas, cada una de las cuales con diferentes propiedades. Al componente de 18 kDa que se une a los iones calcio se le denomina troponina C (TN-C). Un segundo componente de 22 kDa inhibe la interacción entre la miosina y actina y se le designa como troponina I (TN-I). El tercer componente de 38 kDa se une fuertemente a la tropomiosina y es llamado troponina T (TN-T). La composición molecular de todos los músculos esqueléticos vertebrados es similar, aunque los pesos moleculares de estos componentes varían de unas especies a otras (Bandman, 1994).

3.2.1.2.2. Proteínas reguladoras menores

Hay muchas otras proteínas asociadas a los filamentos de miosina y actina que parecen jugar un papel regulatorio.

La proteína M tiene un peso molecular de 165 kDa y se encuentran en la línea M de los filamentos gruesos. Consta de una sola cadena con el 13% de α -hélice y 35% de estructura β , el resto de la molécula es de estructura irregular y no ha sido completamente caracterizada.

La proteína C comprende el 2% de la proteína miofibrilar. Tiene un peso de 135 kDa y un contenido relativamente alto de prolina. La inmunoelectromicroscopía revela que está presente en el segundo tercio de cada mitad de la banda A espaciado a intervalos de 43 nm.

La proteína F tiene 121 kDa y una composición muy diferente de la del resto de proteínas asociadas a la miosina. Se une a los filamentos de miosina, pero esta unión es inhibida por la proteína C.

La proteína I tiene un peso de 50 kDa, con un alto contenido en ácido glutámico y aspártico. Parece localizarse en la banda A, excepto en su región central. En ausencia de Ca^{2+} , la proteína I inhibe la actividad ATPasa de la miosina (Bandman, 1994).

3.2.1.3. Proteínas del citoesqueleto o filamentos intermediarios.

Estas proteínas, distintas de las proteínas miofibrilares, representan una clase de proteínas que desempeñan un papel estructural en la arquitectura de la miofibrilla y de la célula muscular. Todas las células requieren un citoesqueleto, y las fibras musculares no son la excepción. Se cree que estas proteínas dan continuidad mecánica a lo largo de la miofibrilla que en última instancia son quienes proporcionan la elasticidad a la fibra.

La conectina es una proteína de gran peso molecular. Aparece formando una red de filamentos muy delgados, de cerca de 2 nm de diámetro uniendo líneas Z vecinas.

La desmina tiene un peso molecular de 53 kDa y forma los clásicos filamentos intermedios. Parece que hay dos isoformas de desmina, la a y la b. La desmina es soluble a pH bajo, y cuando se dializa frente al agua se polimeriza para formar un retículo de filamentos de 10 nm. Se localiza en la periferia del disco Z y también en los filamentos de 10 nm que unen los discos Z vecinos.

La proteína Z tiene un peso molecular de 50 kDa. Se encuentra sólo en el disco Z, no se ha observado interacción alguna entre la proteína Z y otras proteínas del disco Z, ni con la actina.

Otras proteínas minoritarias parecen formar parte de la línea Z o del citoesqueleto de la fibra muscular. **La vimentina, la sinemina y la paranemina**, son solo algunas de las proteínas parecidas a filamentos que han sido identificadas en fibras musculares (Bandman, 1994).

En la Tabla 1 se muestra la clasificación general de las proteínas miofibrilares en el tejido muscular.

Tabla 1. Proteínas en el tejido muscular de carnes rojas (Mayurama y col., 1977).

	Peso molecular (kDa)	Contenido (%)	Localización
Contráctiles			
Miosina	500	42	Banda A
Actina	43	22	Banda I
Reguladoras mayores			
Tropomiosina	(33 kDa) x 2	5	Banda I
Troponina	70	5	Banda I
Reguladoras menores			
Proteína M	165	2	Banda A
Proteína C	135	2	Banda A
Proteína H	69	<1	Banda A
Proteína F	121	<1	Banda A
Proteína I	50	<1	Banda A
Proteína X	152	<1	Banda A
β -actinina	35	<1	Fin de banda I
γ -actinina	35	<1	Banda I
Filamentos intermedios			
Desmina	53	1	Periferia de miofibrillas
Vimentina	55	1	Entre discos Z
Filamentos elástico conectina	2×10^8	10	Unión A-I
Discos Z			
a-actinina	(95 kDa) x 2	2	Discos Z
Proteína Z	50	<1	Discos Z
Eu-actinina	43	<1	Discos Z
Proteína 34 K	34	<1	Discos Z
ABP (filamina)	(250 kDa) x 2	<1	Discos Z
Otras proteínas			
Vinculina	130	<1	Sarcolema
Nebulina	800	3	Banda I
Paramiosina	34	<1	Unión A-I

A diferencia del tejido de carnes rojas, en el músculo de moluscos la paramiosina alcanza hasta un 50% del total de las proteínas estructurales en sus fibras musculares, su peso molecular oscila entre 95 a 125 kDa, dependiendo de la especie (Kantha y col., 1990; Hultin, 1993; Sirkoski, 1994). En la figura 5, se muestra la organización del músculo esquelético.

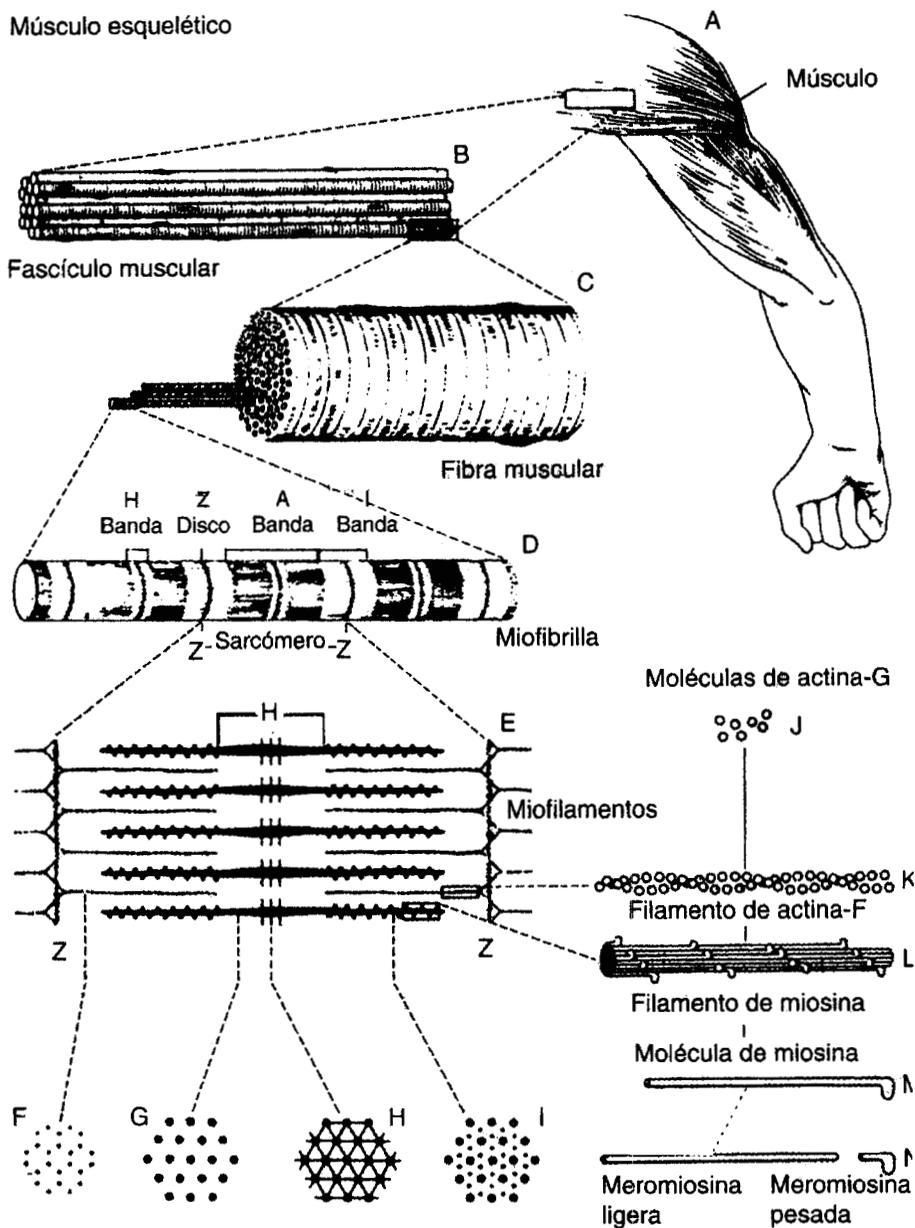


Figura 5. Organización del músculo esquelético.

3.2.2. Proteínas del tejido conectivo

El tejido conectivo existe en forma de láminas, o bandas compuestas de hilos de fibras formadas de tres tipos de proteínas: colágena, elastina y reticulina. El principal papel del tejido conectivo en el músculo es el de soporte de las fibras musculares, y para transmitir la fuerza contráctil al esqueleto y producir movimiento. Dada esta función fisiológica, constituye una estructura mecánica resistente (Valin, 1995).

La proporción de **colágena** en el músculo es generalmente pequeña, en el intervalo de 0.5 a 2%, pero es la proteína más abundante del tejido conectivo. La colágena contiene un 30% de glicina y un 25% de prolina e hidroxiprolina. Cuanto más abunden estos aminoácidos, más rígida y resistente es la colágena. Existen 5 tipos diferentes de colágena: I, II, III, IV y V, que se diferencian por su secuencia de aminoácidos y su estructura. El epimisio está constituido principalmente por colágena tipo I, el perimisio contiene tipo I con poca cantidad de tipo III, la composición del endomisio es más heterogénea, contiene tipo I, III, IV y una pequeña cantidad de tipo V, siendo el tipo III el más predominante. La unidad estructural básica de la colágena es la molécula de tropocolágena, que es larga y delgada y está formada por tres cadenas de polipéptidos enrollados en forma helicoidal, es una unidad muy fuerte y muy compacta. Las unidades están fuertemente unidas para dar firmeza y forma (Carballo y López, 1991, Hultin, 1993, Cassens, 1994, Valin, 1995).

Elastina, ésta difiere de la colágena y de la reticulina en su composición química. La elastina es un componente minoritario en la piel, del tejido adiposo y el conectivo, pero en los ligamentos de los vertebrados y en las paredes de las grandes arterias constituyen una gran parte de la materia seca (Valin, 1995).

Reticulina, es la proteína del tejido conectivo menos conocida. Sus fibras son finas y onduladas, poseen cierto grado de ramificación, y tienen un aspecto distinto al de la colágena, las cuales son más gruesas. La reticulina es más firme que la colágena, sobre todo en el endomisio, constituyendo ligamentos duros pero elásticos y flexibles (Swatland, 1996).

3.3 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS CÁRNICAS

Las propiedades funcionales de las proteínas desempeñan un papel importante en la tecnología de alimentos, tanto en lo referente a los procesos de fabricación, como por su incidencia en los atributos de calidad del producto final. Las propiedades funcionales difieren según el origen de la proteína y, hasta ahora, no se dispone de una proteína que reúna todas las características de funcionalidad, que se necesitan en tecnología de alimentos (Flores y Barmell, 1984b).

Las proteínas miofibrilares, las cuales son las principales contribuyentes en impartir atributos de textura y propiedades funcionales en el músculo, son las más afectadas durante el almacenamiento (Careche y col., 1999). Entre estas propiedades destacan:

- Capacidad de gelificación
- Capacidad de emulsión
- Capacidad de retención de agua

3.3.1 Capacidad de gelificación.

El proceso de gelificación es el resultado de la desnaturalización y agregación para formar una red proteica ordenada, tiene un papel fundamental en la preparación de los productos lácteos, geles de gelatina, productos de carne y pescado, masas panarias, etc. La gelificación, no solo se utiliza para formar geles sólidos, sino también para mejorar la absorción de agua, brindar efectos espesantes, la fijación de partículas, y para estabilizar emulsiones y espumas.

En la mayoría de los casos, la formación de gel requiere un tratamiento térmico, seguido de un enfriamiento, y puede verse favorecida por una ligera acidificación o por adición de iones de calcio. La gelificación inducida por calor es el resultado de una secuencia de eventos que involucran la transformación de una suspensión de proteínas a un estado intermediario o estado de pro-gel y finalmente a un gel (Ponce y col., 2000).

Un gel es un sistema semi-sólido en donde cadenas polipeptídicas forman una red tridimensional en la que retiene y atrapa el agua.

El gel se forma en dos etapas: En la primera hay una desnaturalización o apertura de las cadenas polipeptídicas; después ocurre una ordenación de las cadenas y la formación de una red mediante varios enlaces especialmente puentes de hidrógeno y enlaces disulfuro. De estos enlaces dependen propiedades del gel, tales como viscosidad y elasticidad.

Dependiendo del tipo de enlaces los geles pueden ser reversibles si al calentarse se disuelven y al enfriarse se gelifican, e irreversibles si al calentarse continúan como geles (Carballo y López, 1991).

La actina y miosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles y emulsiones en productos cárnicos. En particular la miosina, tiene un papel fundamental en la

textura y formación de geles inducidos por el calor debido a la agregación irreversible de las cabezas de miosina formando una red tridimensional (Ponce y col., 2000).

La carne del calamar tiene una baja capacidad de formación de gel (Nagashima y col., 1992). Este comportamiento fue atribuido a la alta actividad de proteasas presentes en el manto de algunas especies de calamar que llevan a la degradación de la miosina (Paredi y col., 1999).

3.3.2. Capacidad de emulsión

Se conoce con las siglas CE; se define como la cantidad de aceite medida en mL, que es capaz de emulsionar 1 g de proteína, sin que se rompa o invierta la emulsión.

Las proteínas actúan como agentes emulgentes, se absorben en la interfase orientando los grupos hacia las partículas grasas, y los grupos iónicos hacia la matriz acuosa. La estabilidad de una emulsión depende de múltiples factores como la geometría y el equipo utilizado, la energía aplicada para la formación de la emulsión, la velocidad de adición de la fase grasa, la temperatura de mezclado, el pH, la fuerza iónica, la presencia de agentes de superficie de bajo peso molecular, la exposición al oxígeno, el punto de fusión de la grasa, la concentración y tipo de proteína, del rearrreglo conformacional en la interfase proteína-grasa, la reducción de la tensión superficial, y la formación de una película continua (Carballo y López, 1991, Ponce y col., 2000).

3.3.3. Capacidad de retención de agua.

Capacidad de retención de agua (CRA); se define como la capacidad que tiene la carne para retener el agua, tanto propia como añadida, cuando se le somete a un tratamiento o fuerza exterior (Flores y Bermell, 1984b; Carballo y López, 1991).

La capacidad de retención de agua (CRA) es una propiedad de importancia decisiva en la calidad de la carne, tanto para la destinada al consumo directo como para aquella dirigida a la industrialización. La blandura, jugosidad y el color están íntimamente relacionados con esta propiedad. Las proteínas miofibrilares son las principales responsables de la retención del agua por la carne, entre otras. El 70% del contenido de agua está ubicado en los espacios existentes entre los filamentos gruesos y delgados de la miofibrilla. Del resto, el 20% se encuentra en el sarcoplasma y el 10% en el tejido conjuntivo y espacios extracelulares.

3.3.3.1. Factores que afectan la CRA de la carne

La CRA depende de dos factores fundamentales: el tamaño del sarcómero que es el espacio libre donde se retiene el agua, y la existencia de moléculas que aporten cargas y permitan establecer enlaces dipolo-dipolo con las moléculas de agua.

La cantidad de agua inmovilizada dentro del tejido muscular depende de la disposición de los filamentos delgados y gruesos dentro de la unidad de la fibra muscular. Cuando decrece la cohesión entre los filamentos de actina y miosina, la longitud del sarcómero aumenta, lo cual facilita una mayor retención de agua. En cambio, cuando este entramado es muy denso, por efecto del solapamiento de los filamentos, la longitud del sarcómero disminuye y, como

consecuencia, queda muy poco espacio para albergar a las moléculas de agua (Flores y Bermell, 1984b, Carballo y López, 1991), (Figura 6).

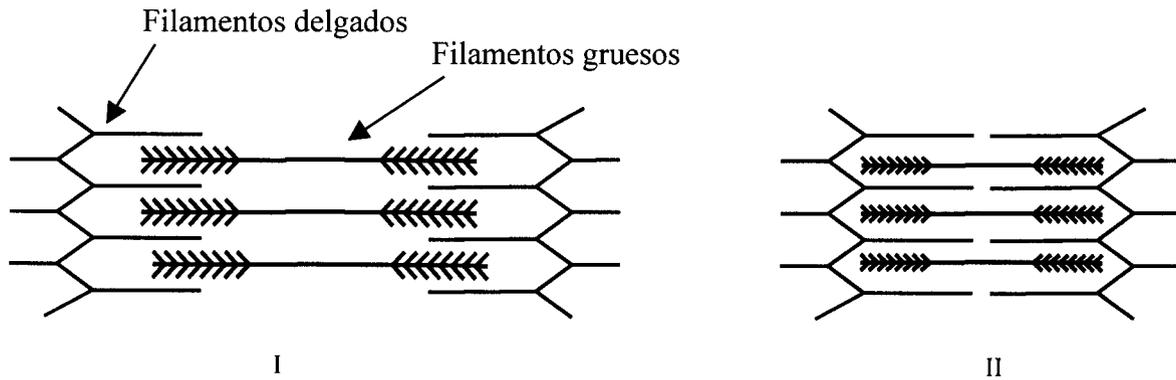


Figura 6. Sarcómero en estado de relajación muscular (I), y en contracción (II) (Flores y Bermell, 1984b).

En esta distensión y acortamiento del sarcómero intervienen tanto la carga eléctrica de las proteínas como la presencia de ATP, que impide la unión de los filamentos de actina y miosina (Flores y Bermell, 1984b).

En suma, todos los factores que afectan a las proteínas miofibrilares tienen una influencia importante sobre la CRA de la carne. Entre ellos merecen citarse el pH, los cambios post-mortem y el efecto de determinadas sales (Flores y Bermell, 1984b).

3.3.3.2. Influencia del pH

El pH influye sobre la calidad de la carne en varios aspectos: el color, la blandura, el sabor, la retención de agua y la conservación. La velocidad y el grado de descenso del pH después del sacrificio de los animales es determinado por la formación de ácido láctico en el músculo (glucólisis) y tiene especial influencia sobre las propiedades de la carne para su transformación. Cuando el descenso del pH es muy rápido a altas temperaturas, se obtiene carne pálida, suave y exudativa (PSE). En cambio, un descenso de pH muy lento origina carne oscura firme al tacto y seca (DFD), la cual se conoce como carne de corte oscuro y es de vida útil reducida. La carne normal se caracteriza por una disminución gradual del pH. De esta manera mediante la medición de pH se puede determinar la calidad de la carne.

A pH 5, punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas cárnicas, adquieren carga neta de cero, por tanto, disminuye la repulsión entre las proteínas. En la figura 7 se muestra la influencia que se tiene de pH sobre la capacidad de retención de agua.

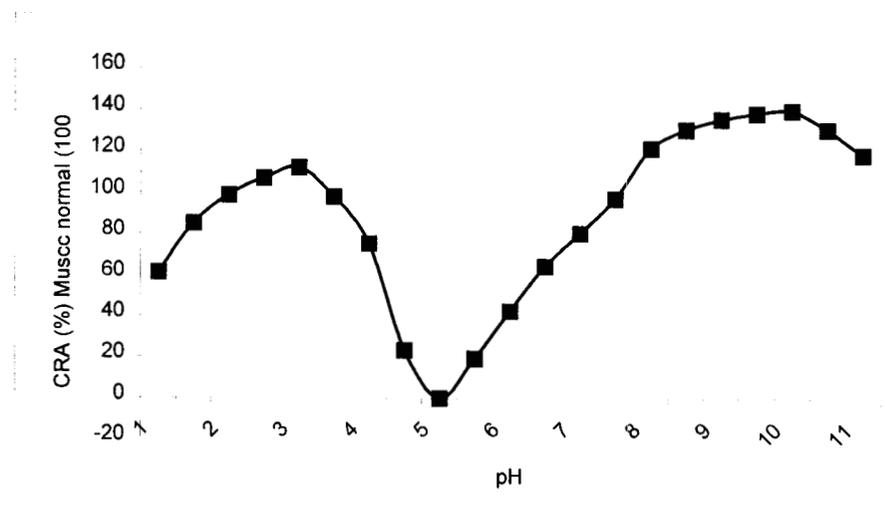


Figura 7. Influencia del pH sobre la CRA (Flores y Bermell, 1984b)

A medida que aumenta el pH, por un lado aumenta la carga y la atracción dipolo-dipolo, y por otro, hay repulsión entre las moléculas de proteínas cargadas de igual signo, aumentando el tamaño de la zona H. Igualmente se comporta al disminuir el pH. Luego la mínima CRA coincide con el pH 5, aumentando a medida que se aleja del mismo (Carballo y López, 1991, Hultin, 1993, Cassens, 1994, Valin, 1995).

3.4. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL TEJIDO MUSCULAR

Las propiedades funcionales de las proteínas desempeñan un papel importante en tecnología de alimentos, tanto en lo referente a los procesos de fabricación como por su incidencia en los atributos de calidad del producto final.

3.4.1. Textura

Una de las principales características de la calidad de la carne se relaciona con la textura, la cual se puede estimar por métodos químicos, medidas de fuerza o compresión, paneles sensoriales y microscópicamente (Taylor y Goll, 1995).

La sensación de dureza es un proceso físico complicado ya que la masticación no sólo implica cortar y triturar, sino también presión, desgarramiento y cizalla. Ya que los movimientos de masticación son tanto laterales como verticales, la dureza es muy difícil de medir instrumentalmente. La medida de la dureza se dificulta no sólo por la complejidad de los movimientos masticatorios, sino también porque las percepciones de dureza llegan al

cerebro desde numerosas neuronas localizadas en la lengua, dientes, labios y boca (Cross, 1994).

Las medidas objetivas se clasifican en mecánicas y fisicoquímicas. La aproximación química en el desarrollo de métodos objetivos da medida del contenido de tejido conectivo. Mitchell y col., (1927) elaboraron un método con este propósito gelatinizando la colágena. Ritchey y Cover (1962) demostraron que el contenido de hidroxiprolina era una medida para extrapolar la cantidad de colágena presente.

Se ha sugerido también una relación entre la capacidad de retención de agua y la dureza. También son factores importantes: la composición y el tratamiento térmico.

Muchos investigadores han intentado usar medidas histológicas para relacionar las variaciones de la dureza, tales como la longitud del sarcómero como medida del acortamiento muscular y de dureza. Se ha empleado con éxito el índice de fragmentación en el músculo. El índice de fragmentación se deriva de procedimientos que miden la fuerza de ruptura del tejido muscular.

A pesar de los defectos de los métodos instrumentales, su objetividad y su simplicidad de aplicación los hacen muy útiles. Pearson (1963) y Szczesniak y Torgeson (1965) ofrecen excelentes revisiones de estas aproximaciones instrumentales. Los clasifican en procedimientos de cizalla, de penetración, de bocado, etc.

Algunos métodos objetivos de evaluar la dureza de la carne incluyen: los instrumentos de cizalla Warner-Bratzler y la máquina de ensayo universal Instron. El instrumento más usado en la medida objetiva de la dureza es la navaja Warner-Bratzler; la cual mide la fuerza necesaria para cizallar y cortar una muestra cilíndrica de carne de 1 mm de espesor. A mayor valor de la fuerza mayor dureza de la carne (Szczesniak y Torgeson 1965). Los factores que

afectan a la exactitud de este instrumento son: la intensidad del tratamiento de cocinado, la uniformidad de la muestra de carne, la dirección de las fibras musculares, la cantidad de tejido conectivo y grasa, la temperatura y la velocidad de corte (Bratzler, 1949). Además, la correlación que ofrece con los datos de paneles de catadores entrenados es alta (Cross, 1994).

Los datos son reproducibles cuando estas tienen un cocimiento previo a una temperatura dada de temperatura interna. Sin embargo, dada la heterogeneidad de un material como la carne, se puede esperar gran variabilidad en las lecturas.

3.4.2. Color

El color del músculo se utiliza para evaluar la calidad. Un color oscuro puede indicar rasgos como edad avanzada, deshidratación o alteración. El color del músculo puede ser medido, bien subjetivamente, utilizando estándares visuales, u objetivamente usando instrumentos (colorímetro diferencial Hunter, instrumento Gofu) para medir el tono, la saturación, la luminosidad y el brillo.

El tono hace referencia a la cualidad por la cual un determinado color es distinto de otro (azul, rojo y verde). La saturación hace referencia a la pureza o intensidad de un color. Mediante la variación de la intensidad, puede aclararse u oscurecerse un color, este valor hace referencia al porcentaje de negro en un color, donde 0 % es negro y 100 % es blanco. La luminosidad es un valor que corresponde al brillo de un color, este valor (brillo) hace referencia a la intensidad que se percibe de un objeto auto iluminado. La cromaticidad define el tono y la saturación o los niveles de color de su monitor (Price y Schweigert, 1994).

3.5. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PRESENTES EN EL TEJIDO MUSCULAR

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferente grado de intensidad y de selectividad.

Las proteasas son clasificadas se acuerdo a su origen que puede ser: vegetal (papaína, ficina y bromelina), animal (catepsina, tripsina y quimotripsina) y microbiológico (subtilina) (Baduí, 1999). También son clasificadas de acuerdo a su acción catalítica como endopeptidasas o exopeptidasas, y de acuerdo a la naturaleza de su sitio catalítico.

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

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

Existen tratamientos *postmortem* que pueden ser aplicados al músculo para activar las enzimas endógenas y, por consiguiente, acelerar el ablandamiento. Uno de estos tratamientos es el de la inyección de cloruro de calcio, ya que se ha demostrado que puede activar ciertas proteasas neutras llamadas calpainas, y que, consecuentemente, producen ablandamiento de la carne (Pérez y Alarcón, 1996).

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

225557

Tal ablandamiento se lleva a cabo mediante la acción de las enzimas proteolíticas, tales como las catepsinas y las calpainas; a pesar de que los valores de pH para su máxima actividad son diferentes del pH de la carne *postrigor*, se ha encontrado que ambos grupos de enzimas mantienen alguna actividad al pH normal de la carne *postrigor*, por lo que a ambos grupos de enzimas se les ha atribuido la mejora en la blandura de la carne.

La actividad de las proteasas en el músculo de pescado es variada y depende de la localización en el músculo, el ciclo de vida del pescado, la presencia de activadores e inhibidores endógenos, pH, y temperatura. Recientes estudios indican que las proteasas neutras y alcalinas tienen más impacto sobre el deterioro *postmortem* en la calidad del músculo del pescado, que las catepsinas activas a pH ácido. La pérdida de calidad es causada por degradación enzimática de la colágena en el tejido crudo, y por las enzimas activadas por calor en geles de pescado (Kolodziejaska y Sikorski, 1996).

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

Existen distintas teorías sobre si el ablandamiento *in vitro* de la carne se debe a la acción de proteasas endógenas, o a la de microorganismos (Eileen y Gill, 1982).

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

3.5.1. Calpainas

Se ha descubierto en el tejido esquelético de ratones un factor activado por Calcio (CAF), que removía rápidamente los discos Z de las miofibrillas. Poco después se observó que las alteraciones estructurales y bioquímicas que ocurren en las miofibrillas durante el almacenamiento *postmortem*, eran muy similares a los cambios que CAF causa en las miofibrillas (Koochmaraie y col., 1984; Koochmaraie y col., 1988).

A las proteasas involucradas en este tipo de actividad se les ha dado varios nombres, tales como proteasas dependientes del calcio (PDC) (Dayton, y col., 1976), proteasa neutra dependiente del calcio, o proteasa activada por el calcio (Koochmaraie y col., 1988). Estos términos fueron unificados por Suzuki y Murachi quienes les dieron el nombre de calpainas (citado por Sorimachi y col., 1996; Dransfield y col., 1992).

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

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

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

significativo en el peso molecular después de que ejerce su actividad proteolítica de 30 kDa a 17 kDa (Croall y col., 1992).

La subunidad pesada se divide estructuralmente en 4 dominios, el segundo dominio es una cisteín proteasa y el cuarto dominio es un ligador de calcio (Reddy y col., 1994). Las funciones del primer y tercer dominio no son conocidas, aunque la estructura del dominio indica claramente que la subunidad pesada fue generada por fusión de genes ancestrales de proteasas (Sorimachi y col., 1994).

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

Se ha reportado la existencia de un inhibidor endógeno de las calpainas llamado calpastatina (Saido y col., 1994; Takano y col., 1995; Doumit y col., 1996; Thomson y col., 1996) que tiene un peso molecular aproximado de 66 kDa (Kendall y col., 1993). En el músculo hay un exceso de calpastatina, por lo que las calpainas no pueden ser activadas (Koohmaraie, 1996). Sin embargo, la calpastatina pierde su actividad muy rápidamente (Koohmaraie, 1992), la regulación de calpastatina y calpainas en vivo no es conocida (Dransfield y col., 1992). Para algunos autores, la calpastatina no es un inhibidor a valores de pH encontrados en la carne, sino que actúa como un substrato de las calpainas, aunque también se ha visto que la calpaina I degrada a la calpastatina, resultado en un decrecimiento de su actividad (Steen y col., 1997). Se ha observado que la proteólisis miofibrilar ocurre en la presencia de calpastatina (Kendall y col., 1993).

3.5.2. Catepsinas

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

Se ha demostrado que en diversos tejidos existen partículas denominadas lisosomas que contienen enzimas con actividad proteolítica óptima a pH ácido, entre ellas se encuentran las catepsinas reconocidas por su participación en el ablandamiento *postmortem*. Los lisosomas tienen membranas lipoproteicas que se hallan intactas a los niveles de pH *postmortem* o cuando el tejido sufre una lesión grave, liberando las enzimas proteolíticas. Las concentraciones de lisosomas varían en diferentes células y tejidos. Las propiedades de las proteasas lisosomales de estos tejidos son similares (Pérez y Alarcón, 1996).

Las enzimas lisosómicas o catepsinas se activan a pH ácidos, degradan la membrana lisosómica y pasan al líquido sarcoplásmico, degradando las proteínas musculares. Se han reportado alrededor de 13 enzimas lisosomales, pero sólo se ha demostrado la presencia de 8 (A, B, C, D, H, L, J y carboxipeptidasa lisosomal) en músculo esquelético, siendo las catepsinas B, D, H y L las mejor caracterizadas (Koohmaraie, 1990).

Por otra parte, debido a que el calamar es una especie con un alto valor proteico, éste contiene grandes cantidades de enzimas proteolíticas (Eileen y Gill, 1982). Se han identificado la catepsinas B, P y E en el tejido del calamar, asimismo una proteínasa cisteína ácida, y una catepsina en *Ommanastrephes sloani*, así como metaloproteasas neutras de algunas especies como *Teuthoidea* y proteasas alcalinas de *Loligo forbesi* (Ebina y col., 1995). Hameed y Hard

(1985) reportaron que el extracto del manto del calamar de la especie *Illex illecebrosus*, contiene una enzima clorada activa la cual cataliza reacciones característica de la catepsina C.

También se han aislado y caracterizado catepsina C del hígado y páncreas del calamar *Illex illecebrosus* y catepsina D de la glándula digestiva del calamar *Todarodes sagittatus*. La concentración de la enzima en la glándula es aproximadamente de 0.5 mg/g de peso seco (Kolodziejska y col., 1994).

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

3.5.3. Acción de proteasas sobre la estructura miofibrilar

A continuación se explica brevemente el efecto de las proteasas sobre la estructura miofibrilar de carnes rojas. En productos marinos no se tiene mucha información sobre esto, sin embargo, se cree que los mecanismos de degradación de la estructura miofibrilar son similares en ambos músculos.

3.5.3.1. Efecto de calpainas sobre la estructura miofibrilar

Se ha visto que la mayor dificultad para determinar la acción de las calpainas en vivo es la identificación de los substratos fisiológicos, sin embargo, se acepta generalmente que el ablandamiento de la carne durante la maduración se debe a la proteólisis de proteínas miofibrilares, en particular de la troponina T y la desmina. Se ha comprobado que las dos

calpainas hidrolizan a las mismas proteínas miofibrilares, además de que se ha observado por microscopía electrónica que las calpainas son capaces de remover los discos Z en el músculo esquelético de conejo, cerdo y pollo. Se ha reportado que las calpainas degradan a la troponina T, la nebulina, la titina y la desmina, y que la miosina, la actina y la α -actina no son degradadas bajo las condiciones similares, (Etherington, 1984). Se supone que la pérdida de estos componentes particulares pueden ser directamente responsables del rompimiento de la fibra muscular (Pérez y Guerrero, 1999).

3.5.3.2. Efecto sobre miosina y actina

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

3.5.3.3. Efecto sobre proteínas reguladoras

Las proteínas reguladoras actúan como su nombre lo indica, regulando el proceso de contracción-relajación de los músculos estriados. Se conocen dos proteínas principales: la troponina y la tropomiosina. La troponina es una proteína globular que consiste de tres polipéptidos denominados según el sitio de interacción con otra molécula tales como troponina

C, troponina T y troponina I (Kawashima y col., 1995). La troponina T es considerada la subunidad más fácilmente degradable por enzimas proteolíticas de la molécula de troponina. Es conocido que el tratamiento de miofibrillas con calpainas muestra un rompimiento de troponina T y la aparición o incremento de intensidad de componentes con pesos de 27, 29, 30, 31, 32 y 33 kDa. La degradación de la troponina T y la aparición del componente de 30 kDa son indicadores del grado de proteólisis (Steen y col., 1997). Penny y Dransfield (1979) observaron que el 60% de la variación en la dureza podría ser explicado por la pérdida de troponina T.

3.5.3.4. Efectos sobre filamentos intermediarios

De los filamentos intermediarios, la titina también llamada conectina es degradada en péptidos pequeños durante el cocinado de la carne fresca o durante el almacenamiento *postmortem* (Fritz y Greaser, 1991). Suzuki y col., (1997) sugieren que la proteólisis de α -conectina por calpainas resulta en la formación de β -conectina y péptidos muy pequeños, las enzimas lisosomales, específicamente la catepsina D, también hidroliza a la conectina; sin embargo los mecanismos no están bien definidos (Steen y col., 1997).

Otra proteína de los filamentos intermediarios es la nebulina, la cual es degradada rápidamente en condiciones *postmortem* (Fritz y Greaser, 1991; Greaser y Fritz, 1995); es lógico postular que el rompimiento de una o ambas de estas proteínas *postmortem* debería modificar la estructura miofibrilar e incrementar la blandura de la carne durante el almacenamiento.

La desmina es otro filamento intermediario que también decrece rápidamente en condiciones *postmortem*, ha sido postulado que la destrucción de esta proteína es la razón para la reducción en el alineamiento del sarcómero de miofibrillas adyacentes que ocurre *postmortem* (Greaser y Fritz, 1995).

3.5.3.5. Efecto de catepsinas sobre la fracción muscular

La catepsina B es una proteasa lisosomal que degrada miosina, troponina I y actina. Estos datos sugieren que la actividad de la catepsina B más catepsina L podrían tener una influencia predominante en los cambios en blandura durante el almacenamiento (Jonson y col., 1990). La actividad de la catepsina B y la de la catepsina L es máxima a pH ácido de 4 a 6 (Etherington y col., 1987). La catepsina D degrada la miosina y la actina. Se conocen tres enzimas lisosomales que poseen actividad colagenolítica, catepsina B, L y N. Las catepsinas B y L pueden estar involucradas en el rompimiento de la estructura miofibrilar, pero la catepsina N parece tener una acción muy limitada en las proteínas como la colágena. (Etherington, 1984).

En la tabla 2, se presentan las principales características de las proteasas endógenas.

Tabla 2. Propiedades funcionales de las proteasas endógenas (Carballo y López, 1991, Beynon y Bond, 1994).

Enzimas	Forma de acción	PM (peso molecular)	pI (punto isoelectrico)	pH	Substratos
Catepsina D	Endo	42.000	5.5-6.5	3-5	Actina Miosina Troponina T Troponina I Línea Z
Catepsina H	Endo	28.000	7.1	5.5-	Actina
	Exo			6.5	Miosina
Catepsina L	Endo	24.000	5.8-6.1	4-6.5	Actina Miosina α -actinina Troponina T Troponina I Colágena
Calpaina I y II	Endo	80.000 30.000 (dos subunidades)		6.5-8	Desmina Troponina T Troponina I Tropomiosina Conectina

3.5.4. Actividad proteolítica en el músculo de productos marinos

Las endopeptidasas son las proteasas más utilizadas en el procesamiento de alimentos, por ejemplo las proteasas del hígado del calamar podrían tener un uso potencial para su aplicación en el procesamiento de alimentos del mar y en otras ramas de la industria alimentaria. Asimismo, tanto el hígado como el páncreas del calamar son una buena fuente de enzimas que son exitosamente usadas para incrementar la velocidad de proteólisis en la preparación de salsa de pescado (Kolodziejaska y col., 1994). En algunos casos la acción de algunas proteasas es suplida con exopeptidasas, para que pueda llevar a cabo su actividad proteolítica necesitan de algunos compuestos como el calcio en el caso de las calpainas (Okamoto y col., 1993).

Sakai y col., (1981), observaron que la actividad máxima del extracto crudo del manto del calamar *Ommastrephes sloani pacificus* se obtuvo a un pH de 2.9 a un intervalo de temperatura de 35-40°C. Deng (1981), observó que la actividad de la proteasa alcalina del pescado, se encontró a un pH de 8 y una temperatura de 65°C.

Asimismo Eillen y Gill (1982), observaron que para las especies de calamar *Illex illecebrosus* y *Loligo pelalei teseur*, la actividad máxima de sus proteasas están a un pH de 2.6 y 3.6 respectivamente, sin embargo, también lograron observar actividad a pH alcalino (7.5-8.9).

Okamoto y col., (1993), observaron que las dos metaloproteasas (miosinasa I y miosinasa II), del manto del calamar *Todarodes pacificus*, presentan una actividad óptima a pH de 7 y a una temperatura de 40°C.

En el extracto obtenido del hígado del calamar *Illex argentinus*, se observó una actividad proteolítica óptima a un intervalo de pH de 2.6-4 (Kolodziejaska y col., 1994).

Por otro lado Castellanos y Morales (2000), realizaron estudios con el extracto crudo del manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*, en el cual encontraron que la actividad máxima del extracto se presentó a un pH de 3 y de 7 y a una temperatura de 35°C.

3.5.5. Acción de proteasas endógenas sobre el músculo después de la muerte del animal.

Después de la captura y muerte del pescado, éste sufre inmediatamente un deterioro debido a que ocurre una liberación de sus propias enzimas. Así, por ejemplo, las proteasas comienzan la hidrólisis de las proteínas musculares, lo que se traduce en un ablandamiento lento en los

225557

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

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

1. Estadio de **IRRITABILIDAD** o de *pre-rigor*.

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

2. Estadio de **RIGOR MORTIS** o de rigidez cadavérica.

Esta etapa comienza cuando los valores de pH del músculo llegan a su valor mínimo. Aquí los sarcómeros se encuentran contraídos y existe una formación irreversible de actomiosina. Se caracteriza este estadio, porque el pescado se torna rígido y duro por la contracción de las proteínas miofibrilares. El pH del músculo se encuentra en el entorno de 6. El rigor comienza en la región de la cabeza, propagándose luego, a la región de la cola, desapareciendo luego en el mismo sentido que se instala. Este estado comienza de 1 a 7 horas *postmortem* y su duración es variable, de acuerdo a varios parámetros como pueden ser estado de fatiga, reservas de glucógeno, estado reproductivo, estado nutricional, etc.

3. El tercer estadio es llamado de **ALTERACIÓN** o de *post-rigor*.

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

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

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

3.5.5.1. Degradación de los compuestos nitrogenados

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

3.5.5.1.1. Nitrógeno proteico.

Los cambios autolíticos de las proteínas son debidos a la acción de catepsinas. Éstas producen la degradación (hidrólisis) de las proteínas hasta péptidos y a aminoácidos. El aumento de la concentración de aminoácidos libres en el músculo, constituye un medio adecuado para el crecimiento bacteriano. Por la acción enzimática de estas bacterias ocurre la descarboxilación de algunos aminoácidos, originando de esta manera aminas biogénicas, que se acumulan o entran en los restos del proceso de putrefacción.

Estos productos finales van a influir fundamentalmente en el olor que se percibe durante el examen organoléptico. Entre los compuestos finales de la degradación de los aminoácidos, están los siguientes:

La **arginina** da como producto final **NH₃** (por una deasminación).

La **histidina** da como producto final **histamina** (por una descaboxilación).

La **lisina** da como producto final **cadaverina** (por una descaboxilación).

La **glutamina** da como producto final **putrescina** (por una descaboxilación).

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

3.5.5.1.2. Nitrógeno no proteico.

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

En la Figura 8, se muestra la formación de las principales aminas volátiles en productos marinos frescos.

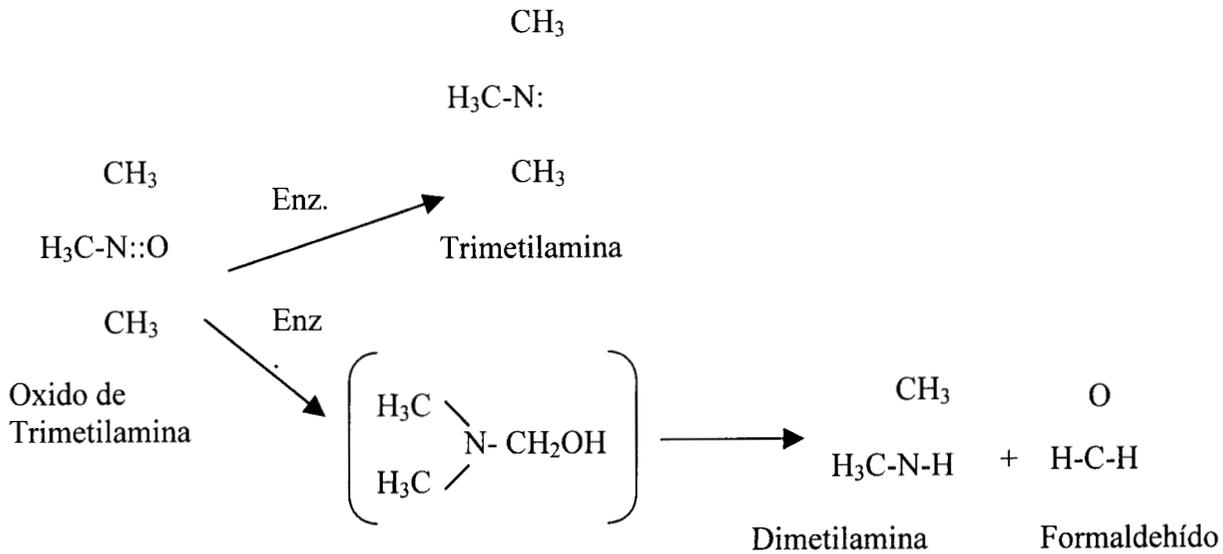


Figura 8. Formación de las principales aminas volátiles en productos marinos frescos (Lindsay, 1993).

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

Navarro en 1999, observó que durante el almacenamiento en congelación del calamar y cazón, hubo un aumento de formaldehído, presentándose una mayor cantidad en el calamar.

3.6 INHIBIDORES

Estos compuestos son generalmente proteínas de peso molecular bajo con capacidad de asociarse con las enzimas proteolíticas, y formar un complejo estable que no tiene actividad catalítica (Baduí, 1999).

La proteólisis es el mayor problema tanto en la purificación de proteínas (Murray, 1990), como en la alteración de la textura de carnes rojas, pescados y moluscos durante su almacenamiento (Jiang y Lee, 1985; Ebina y col., 1995).

Algunos inhibidores de proteasas se recomiendan, aún si las proteínas son almacenadas de 0-4 °C durante su purificación, ya que las proteasas bajo estas condiciones aún pueden actuar hidrolizando a las proteínas de interés. Un gran número de inhibidores de proteasas están disponibles comercialmente, los cuales pueden actuar sobre distintos tipos de proteasas. En la Tabla 3 se muestran algunos de ellos.

Tabla 3. Inhibidores de proteasas más comúnmente utilizados

Inhibidor	Clase de proteasa inhibida	Concentración utilizada
PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro)	Serin-proteasas	0.1-1 mM
EDTA	Metalo-proteasas	0.1-1 mM
Iodoacetamida	Cistein-proteasas	~1 mM
Pepstatina A	Proteasas-ácidas	~1 µg/mL
Leupeptina	Tilo-proteasas	~1 µg/mL
Inhibidor de tripsina	Serin-proteasas	~5 µg/mL
Quimostatina	Serin-proteasas	~20 µg/mL
Antipaina	Tilo-proteasas	~1 µg/mL

(Murray, 1990; Beynon y Bond, 1994).

En la Tabla 4 se muestran distintas enzimas proteolíticas con el grupo amoniácido que caracteriza su centro activo, así como el pH óptimo y sus inhibidores.

Tabla 4. Enzimas proteolíticas presentes en el tejido muscular

	Serin- proteasas	Cistein- proteasas	Aspártico- proteasas	Metallo- proteasas
Centro activo	Serina	cisteína	2 residuos de aspártico	Un catión metálico
Enzimas	Tripsina	Catepsina B Catepsina H Catepsina L Calpaínas	Catepsina D	Colagenasa
Margen del pH	7-9	3-8	2-7	7-9
Inhibidores	PMSF	Iodoacetato	Pepstatina A	EDTA

(Carballo y López, 1991).

En el caso del calamar, éste es exportado de la India en forma de mantos y tubos congelados. Su almacenamiento en congelación ayuda a prolongar la vida de anaquel, retardando la degradación enzimática y microbiana; pero la hidrólisis de la proteína ocurre durante el prolongado almacenamiento resultando en una pérdida de humedad y cambios en la textura (Selvaraj y col., 1992).

Konno y Fukazawa (1993), observaron el efecto de algunos inhibidores sobre el homogeneizado del manto del calamar, encontrando que a 25°C el EDTA, el EGTA y el pirofosfato fueron efectivos en la inhibición, aunque no totalmente, por lo cual se ha sugerido la presencia de otras proteasas además de las calpains en el manto del calamar (Okamoto y col., 1993).

A pesar que el EDTA es uno de los inhibidores más efectivos, su uso no está permitido por la FDA como un aditivo para productos cárnicos (Konno y Fukazawa, 1993), por lo que se usa el pirofosfato, aunque éste se requiere de una concentración 10 veces mayor para lograr el mismo grado de inhibición. La inhibición máxima se tiene a 10 mM, mientras que para el EDTA es 1mM (Konno y Fukazawa, 1993).

Por otra parte, Ponce y col. (1999), observaron una fuerte inhibición proteolítica en el extracto del manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*, al utilizar pepstatina A, la cual inhibió en un 83.87% la actividad proteolítica a un pH de 3, y un 87.65% a un pH de 7.5, con lo cual se concluye que hubo inhibición de catepsinas y calpaínas, respectivamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar y caracterizar parcialmente la actividad de las enzimas proteolíticas presentes en el músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

OBJETIVOS PARTICULARES:

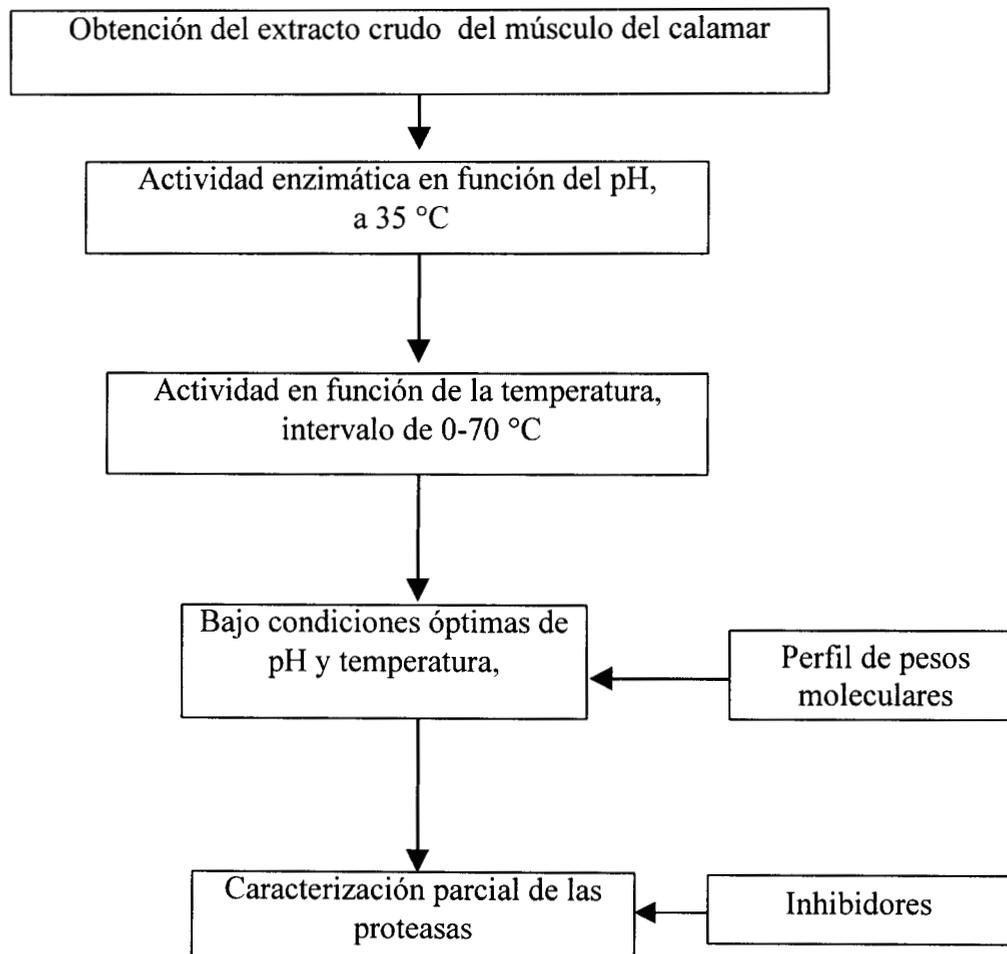
- Estudiar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica en el extracto crudo del manto del calamar.
- Caracterizar parcialmente las proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar adicionando inhibidores.
- Determinar el perfil de pesos moleculares de las proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar por medio de electroforesis y/o filtración en gel.
- Evaluar el efecto de la actividad proteolítica en los parámetros de calidad del músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en dos etapas:

1. Caracterización parcial de las proteasas presentes en el extracto enzimático del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
2. Evaluación de la actividad proteolítica durante el almacenamiento del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Diagrama de flujo de la caracterización parcial de proteasas presentes en el extracto enzimático del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).



225557

5.1 CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEASAS PRESENTES EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DEL MANTO DEL CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*).

El manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), fue adquirido en la Central de Abastos de la Nueva Viga. Éste se dividió en porciones de 100 g cada uno, los cuales se envasaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en congelación a -80 °C para su posterior utilización.

5.1.1 Obtención del extracto enzimático crudo del manto del calamar

Se tomó una porción del calamar congelado, se hicieron cortes finos de aproximadamente 3 mm, y posteriormente se homogeneizaron con un amortiguador de fosfatos (20 mM, pH de 7 y 0.9% de NaCl), en una proporción 1:1 (p/v). Posteriormente el extracto se sometió a centrifugación en frascos de 250 mL utilizando una centrífuga Beckman mod. J2-MI (Palo Alto, CA) utilizando un rotor JA-14, a 11,000 g durante 20 min a 4 °C.

El sobrenadante obtenido fue considerado como el extracto crudo del manto del calamar.

5.1.2 Actividad proteolítica del extracto crudo del manto del calamar

La determinación de la actividad proteolítica se llevó a cabo por medio de los métodos de Kunitz (1947), utilizándolo como substrato la caseína al 1% (en una disolución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7, NaCl 0.9%) y el de Anson reportado por Ouali y Valin (1980) utilizando hemoglobina al 1% (en una disolución amortiguadora universal 25 mM). Para la

preparación de hemoglobina y caseína ver Anexo I. El sustrato se incubó a la temperatura de prueba durante 10 min en un baño de temperatura controlada; una vez adicionado el extracto enzimático, se incubó por diez minutos para que se pudiera llevar a cabo la hidrólisis, la cual se detuvo con la adición de una disolución de Tricloroacético al 50%, se enfrió por 10 min a 4 °C y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 11000 g a 4 °C, con el fin de remover la proteína insoluble en ácido. Se determinó la absorbencia del sobrenadante a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton, CA).

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

5.1.2.1 Determinación de la actividad proteolítica con respecto a la temperatura y pH

Para determinar el pH de máxima actividad, se utilizó la temperatura óptima de trabajo reportada por Ponce y col. (1999), la cual fue de 35 °C, asimismo se trabajó alrededor de los pH óptimos encontrados de máxima actividad, los cuales fueron de 3 y 7.5.

5.1.2.1.1 Actividad en función del pH

Se determinó a la temperatura de prueba de 35 °C, variando el pH en la región de 1.5 a 4.5 y 7 a 8 a intervalos de 0.2 unidades de pH. Para cada uno de estos se utilizó un sustrato adecuado; es decir, para pH ácidos se utilizó hemoglobina al 1%, y para pH alcalinos se utilizó caseína al 1%.

5.1.2.1.2 Actividad en función de la temperatura

Se determinó utilizando como sustrato hemoglobina y caseína al 1%, al pH óptimo encontrado en el punto 6.1.4.1, variando las temperaturas desde 0 hasta 70 °C.

5.1.3 Determinación de proteína

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

5.1.4 Efecto de inhibidores proteolíticos

Para estudiar el efecto de inhibidores proteolíticos sobre el extracto enzimático del manto del calamar, e identificar así el tipo de proteasas presentes se utilizaron como sustratos hemoglobina y caseína al 1%, adicionándose inhibidores como EDTA, pirofosfato (Konno y Fukazawa, 1993), pepstatina A, leupeptina (Murray, 1990), PMSF, iodoacetato (Carballo y López, 1991), inhibidor de tripsina, quimostatina con la concentración que se muestra en la Tabla 5, siguiendo la metodología 5.1.2. para poder determinar el efecto de adición de inhibidores.

Tabla 5. Inhibidores proteolíticos utilizados.

Inhibidor	Concentración
Pepstatina A	10 µg/mL
Quimostatina	20 µg/mL
Leupetina	10 µg/mL
PMSF	1 mM
Inhibidor de tripsina	0.25 µg/mL
EDTA	2 mM
CaCl ₂	5 mM
Pirofosfato	10 mM
Iodoacetamina	5mM

5.1.5 Purificación parcial del extracto enzimático crudo del manto del calamar gigante

Se concentró el extracto crudo del manto del calamar por medio de precipitación fraccionada con sulfato de amonio 40-60%, y centrifugando durante 20 min a 11,000 g. El sobrenadante se dializó contra una disolución amortiguadora de fosfatos (0.25 mM, pH 7 - 0.9% NaCl), durante 24 hr a 4 °C. El sobrenadante dializado se usó para realizar el fraccionamiento de las proteínas por medio de filtración en gel (HPLC). La columna fue eluida con amortiguador de fosfatos 0.25 mM, pH 7 NaCl 0.9%. La muestra utilizada fue de 500 µL y la velocidad de flujo fue de 0.25 mL/min, colectándose fracciones de 1mL. Una vez obtenidas éstas, se ajustaron a los diferentes pH de trabajo.

Se colectaron 23 fracciones, las cuales se sometieron a un análisis de actividad proteolítica mediante los métodos de Kunitz y Anson. Del mismo modo, la cantidad de proteína para cada una de las fracciones fue evaluada mediante el método de biuret, también se determinó el perfil de pesos moleculares de cada una de las fracciones.

Las determinaciones para cada uno de los experimentos realizados se hicieron por triplicado

5.1.6 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar

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

5.1.6.1 Electroforesis desnaturalizante

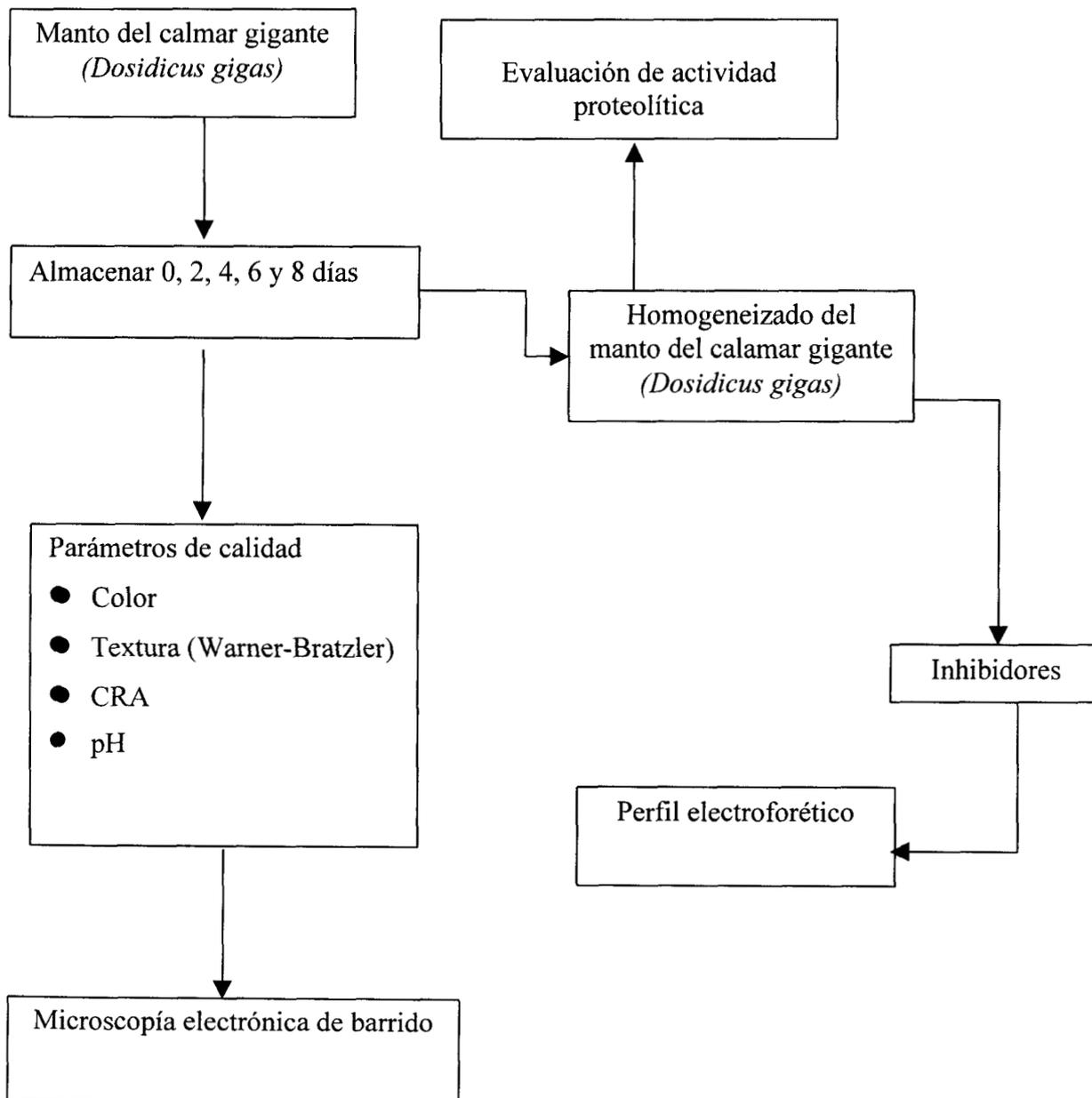
Las muestras del extracto crudo, se sometieron a la técnica de electroforesis desnaturalizante utilizándose la técnica reportada por García y col. (1993). Se analizaron un volumen de 15 μL de la muestra y uno de 10 μL del marcador de peso molecular. El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 200 volts, utilizándose un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, CA.) a 4 °C. Después del análisis, los geles se desmontaron y se tiñeron en una disolución 0.1% de azul de Coomassie R-250 durante 30-40

min. Finalizado este tiempo, los geles se colocaron en una disolución desteñidora, haciendo los recambios necesarios de esta disolución, de forma que se pudieran ver con claridad las bandas de las proteínas en estudio.

La digitalización y análisis de los geles se llevó a cabo mediante un equipo Gel Doc 1000 (BioRad.). En la determinación de los pesos moleculares se utilizó a su vez el software “Molecular Analysis”, con el que se graficó el Rf (distancia de migración desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda de la proteína, entre la distancia que recorre el frente de color), de cada banda, contra el logaritmo del peso molecular del patrón de referencia. Posteriormente se calculó el peso molecular de cada banda mediante la interpolación de cada Rf de las bandas problemas en la curva patrón elaborada (Rf vs log PM). La elaboración de los reactivos se describe en el Anexo III.

5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL HOMOGENEIZADO DEL MANTO DEL CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*)

Diagrama de flujo de la evaluación de la actividad proteolítica durante el almacenamiento del manto del músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)



5.2 Evaluación de la actividad proteolítica durante el almacenamiento del homogeneizado del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

El manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se troceó en porciones de 100 g cada una, las que se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante ochos días periodo durante el cual se realizaron los análisis correspondientes.

Para lo cual se tomó una porción del calamar refrigerado y se hicieron cortes muy finos para posteriormente ser homogeneizados con un amortiguador de fosfatos 20 mM, pH de 7 y 0.9% de NaCl, en una proporción 1:1 p/v.

5.2.1 Actividad proteolítica del homogeneizado del manto del calamar gigante

La determinación de la actividad proteolítica se llevó a cabo mediante la metodología 5.1.2, utilizándose como substrato el homogeneizado del manto del calamar gigante. El substrato se incubó al pH y temperatura óptima de acuerdo a las secciones 5.1.2.1.1 y 5.1.2.1.2 respectivamente, la reacción se detuvo con la adición de una disolución de TCA al 10%, se enfrió por 10 min a 4 °C y se centrifugó durante 15 min a 11,000 g, con el fin de remover la proteína insoluble en ácido. Se midió la absorbencia del sobrenadante a 280 nm.

5.2.2 Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica

Para observar el efecto del almacenamiento sobre el manto del calamar gigante, se obtuvo un homogeneizado de éste, en un amortiguador de fosfatos 20mM pH 7, NaCl 0.9%. Una vez obtenido se ajustó a los diferentes pH utilizados en la primer parte de este trabajo, luego se

almacenó a 4 °C, durante 0, 4 y 8 días. Se midió la actividad enzimática cada vez, mediante la metodología 5.1.2.

5.2.3 Adición de inhibidores proteolíticos

Para observar el efecto que tienen los inhibidores sobre el homogeneizado del manto del calamar gigante, se utilizaron los indicados en la sección 5.1.5, determinándose la actividad proteolítica siguiendo la metodología 5.1.2. Esta medición se realizó a los días cero y tres.

5.2.3.1 Perfil de pesos moleculares de proteínas miofibrilares del homogeneizado del manto del calamar gigante

Para observar el efecto de la adición de inhibidores sobre el homogeneizado del manto del calamar gigante, se determinó el perfil de pesos moleculares siguiendo la metodología 5.1.5, para lo cual se extrajeron las proteínas miofibrilares (Anexo IV), en cada uno de los días de almacenamiento.

5.2.4 Cambios de los parámetros de calidad del manto del calamar durante el almacenamiento

Se pretendió relacionar la presencia de ciertas actividades proteolíticas, con el deterioro de la calidad del manto, evaluando color, textura, CRA y pH debido a la actividad enzimática de las proteasas presentes en éste, a un tiempo determinado de almacenamiento.

El calamar gigante fue troceado en porciones de 100 g y empacado. Se almacenó durante 8 días. Al momento de utilizar las muestras para su análisis, la mitad de éstas, se cocieron a una temperatura interna de 70 °C, la otra mitad se utilizó de forma cruda.

5.2.4.1 Color

Se midió utilizando un colorímetro Hunter Lab, (Chroma Meter CR-200, Japan 80025393, Tokio, Japón) modelo D25-PC2, por el método descrito por Little (1975), citado por Pérez, 1998, empleando como estándar los siguientes valores: L=97.3, a=0.17, b= 1.9. Las muestras se leyeron por triplicado, rotando el portamuestra 90° en cada lectura. Los valores a y b se transformaron a coordenadas polares, para obtener valores de cromaticidad y tonalidad mediante las ecuaciones 1 y 2. El valor de la Luminosidad L, es igual a la reportada por el equipo.

$$\text{Tonalidad} = \text{Tan}^{-1}(b/a) \dots\dots\dots\text{Ecuación 1}$$

$$\text{Cromaticidad} = (a^2 + b^2)^{1/2} \dots\dots\dots\text{Ecuación 2}$$

La determinación de color se llevó a cabo en el manto del calamar gigante, almacenado a los días 0, 4, 8 y 15.

5.2.4.2 Textura

225557

Se utilizó un analizador de textura, TA-XT2 (Texture Technologies Corp., Scarsdale, New York) y el software TEXTURE EXPERT v1.2 (Stable Micro Systems, Ltd, Surrey,

Inglaterra). Las muestras fueron cortadas en forma de cubos de 1 cm por lado, y se cocieron hasta que alcanzaron una temperatura interna de 70 °C.

Se evaluó el esfuerzo al corte por medio de la navaja Warner-Bratzler, la cual reportó la fuerza máxima para deformar la muestra a un porcentaje determinado, al aplicársele una fuerza conocida (Warner y Bratzler, 1947). Se utilizó una celda de carga de 5 Kg, con una sensibilidad de 4.5 Kg. El corte se realizó perpendicular a las fibras musculares.

5.2.4.3 Capacidad de retención de agua

Se llevó a cabo mediante el método de Hamm (1975) y Price y Schweigert (1981). Se molieron 10 g de músculo de calamar y se colocaron 5 g en un tubo de centrifuga. Se añadieron 8 mL de una disolución de NaCl 0.6 M, se agitó con una varilla de vidrio durante 1 min en un baño de hielo. Posteriormente se dejó en éste durante 30 min, y se agitó de nuevo por 1 min. Se centrifugó a 8.000 g por 15 min, se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl 0.6 M retenido por 100 g de músculo.

5.2.4.4 pH

Se llevó a cabo mediante el método de Owen y col. (1982). Se tomaron muestras de 10 g de músculo, se homogeneizó durante 1 min usando una licuadora doméstica con 90 mL de agua destilada. Se filtró a través de una manta de cielo para eliminar el tejido conectivo. Se utilizó un potenciómetro digital (Conductronic 50-66Hz., 127V), después de haber calibrado el electrodo con un amortiguador de sodio y potasio a pH 4 y 7.

Cabe mencionar que las determinaciones para cada uno de los experimentos realizados en el presente trabajo se hicieron por triplicado

5.2.5 Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar el efecto del almacenamiento sobre el manto del calamar gigante, se utilizó una técnica de evaluación estructural de la muestra, utilizando la microscopía electrónica de barrido (SEM).

- **Preparación de las muestras**

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

- **Fijación primaria**

Los cortes se sumergieron en gluteraldehído disuelto al 5% en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4, hasta que se observó que las muestras tuvieran un color anaranjado oscuro, lo cual fue en un periodo de 24 hr aproximadamente. Posteriormente, los cortes se colocaron en

viales de 2.5 ml que contenían la disolución de glutaraldehído durante 24 hr a 4 °C. Después se realizó un lavado rápido de los cortes con un amortiguador de fosfatos pH 7.4, y después lavados cada 15 min, hasta eliminar el olor a glutaraldehído.

- **Fijación secundaria**

Después de los lavados, los cortes se colocaron en una disolución de tetróxido de osmio (Os_5O_4) durante un período de 2 hr, al finalizar este tiempo se realizaron lavados utilizando etanol a las siguientes concentraciones 30, 40, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto, durante 20 min cada vez.

- **Desecación**

Terminados los lavados, las muestras se colocaron en microcápsulas de tipo poroso, se etiquetaron y se pusieron en contacto con etanol absoluto. Posteriormente se desecaron en un desecador de punto crítico Samdri-780 B (Sample Drying at the critical point, E. U) a las condiciones arriba del punto crítico del CO_2 : 1070 psi y 31 °C.

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

- **Recubrimiento**

El recubrimiento se realizó en un cubridor de posición por ionización (BAL-TEC SCD , 050 Liechtenstein). Primero se realizó una cubierta por medio de una evaporación al vacío de carbón, y después una segunda con de oro-paladio por ionización al vacío. Una vez listas las muestras, se observaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL JSM-5900 LV, Japón) y se operó a 8kv de aceleración, con una resolución de 1000x y 4000x.

5.2.6 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y comparación múltiples de medias de Duncan, con el fin de determinar los pH y temperatura óptimos. Los mismos métodos estadísticos se aplicaron a los resultados de inhibidores, color y textura. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico “SPSS 8.0 for windows”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS PROTEASAS PRESENTES EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO CRUDO DEL MANTO DEL CALAMAR UTILIZANDO UN SISTEMA MODELO DE HEMOGLOBINA Y CASEÍNA COMO SUSTRATOS.

6.1.1 Actividad en función del pH

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica del manto del calamar gigante se muestra en la Figura 9, en donde se observa el intervalo de pH a una temperatura constante de 35°C, se obtuvieron cinco picos para la actividad proteolítica: 2.7, 3.1, 6.1, 7.3 y 7.6, ($P < 0.0001$) (Tabla 6 y 7).

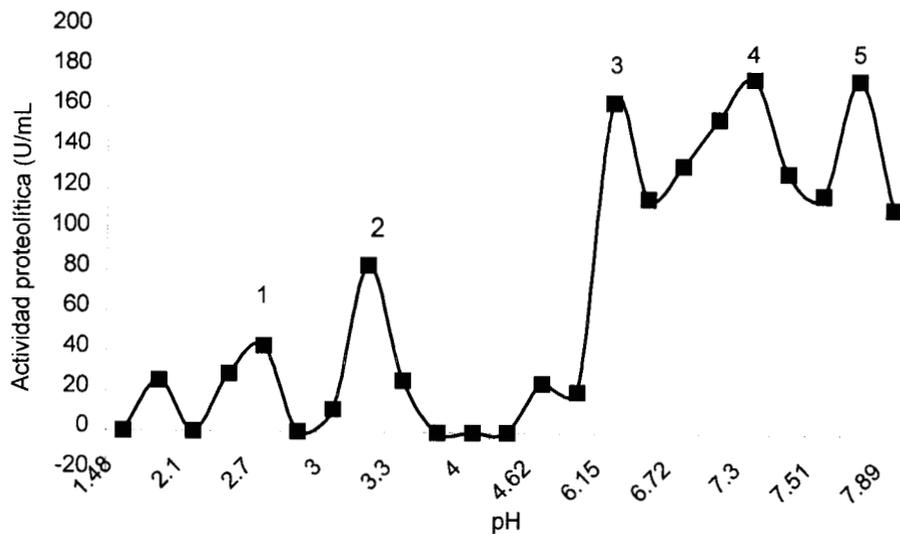


Figura 9. Efecto del pH en la actividad proteolítica de las proteasas presentes en el manto del calamar gigante a 35°C

En las tablas 6 y 7 se muestra la comparación de medias del efecto del pH sobre la actividad proteolítica, observándose que para pH ácidos el valor en el cual se obtuvo la actividad proteolítica más alta fue a 3.1 y para pH alcalinos fueron de 7.3, 7.6 y 6.15.

Tabla 6. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la actividad proteolítica (U/mL).

pH	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
1.48	.00					
1.80			25.48	25.48		
2.10	.00					
2.40				28.72		
2.70					43.04	
2.89	.00					
3.00		11.28				
3.10						83.12
3.30			26.00	26.00		
3.63	.00					
4.00	.00					
4.34	.00					
4.62			24.83	24.83		
5.03			20.48			

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

Tabla 7. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la actividad proteolítica (U/mL).

PH	Grupos			
	1	2	3	4
6.15			163.32	163.32
6.43	116.40	116.40		
6.72		132.16		
7.03			155.20	
7.30				175.00
7.40		128.72		
7.51	118.28	118.28		
7.61				174.32
7.89	111.60			

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

La existencia de varios picos de actividad sobre este amplio espectro de pH indica la presencia de proteasas ácidas, neutras y alcalinas en el extracto crudo del manto del calamar gigante. Leblanc y Gill (1982), reportaron diferentes picos de actividad dependiendo del pH en músculo de calamar a 2.6 y 3.6 en *Illex illecebrosus* y *Loligo pealei*, respectivamente. Sakai y Matsumoto (1981), encontraron sólo un pico a pH de 3.1 en *Ommastrephes sloani pacificus* y Rodger y col. (1984), encontraron uno a pH de 7.5 en *Loligo forbesi*.

El pH óptimo para la actividad de catepsina D es alrededor de 3 a 4.5 (Zeece y Katoh, 1989), mientras que otras catepsinas son más activas en intervalos más ácidos (Ashie y col., 1996). Asimismo, Hurtado y col. (1999), reportaron una elevada actividad proteolítica en un intervalo de pH de 2 a 4.5, con lo cual puede decirse que el extracto enzimático crudo podría tener este tipo de enzimas debido al pH encontrado de actividad máxima.

La actividad de algunas enzimas puede ser afectada por el incremento del pH, por ejemplo algunas isoenzimas de catepsinas D tienen su pI en un intervalo de 5.7 a 6.9 (Zeece y Katoh, 1989). Makinodan y col. (1982), reportaron que catepsinas A y D aisladas del músculo de la carpa no tuvieron actividad a pH de 6 ó mayores.

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

En el análisis de actividad a pH 2.7 y 3.1 se observó que aunque la actividad proteolítica fue alta a esos valores, la actividad a pH 6.1, 7.3 y 7.6 fue más alta ($P < 0.0001$); esta diferencia pudo deberse a que las proteasas con actividad óptima a pH alcalinos tienen un mayor efecto sobre el músculo fresco que las proteasas con actividad óptima a pH ácidos (Ashie y col., 1996).

La actividad específica para cada pH se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación del pH óptimo de actividad del extracto crudo del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) a 35°C

pH	Actividad Proteolítica (U/mL)	Actividad específica (U/mg de prot)
2.7	43.04	2.842
3.1	83.12	5.490
6.1	163.32	10.787
7.3	175	11.558
7.61	174.32	11.513

6.1.2. Actividad proteolítica en función de la temperatura

En las Figuras 10 y 11 se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica para los siguientes valores de pH: 2.7, 3.1, 6.1, 7.3 y 7.6. En la Tabla 9 se reporta la actividad proteolítica en un intervalo de temperatura de 4 a 70°C, observándose que hubo diferencia significativa ($P < 0.0001$) en cada una de estas, teniéndose un aumento de la actividad proteolítica a los 35°C, en los cinco valores de pH estudiados. Al medir la actividad a

temperaturas superiores a los 40°C, se observó una drástica pérdida de la misma a los pH ácidos, sin embargo a pH alcalinos la actividad disminuyó ligeramente.

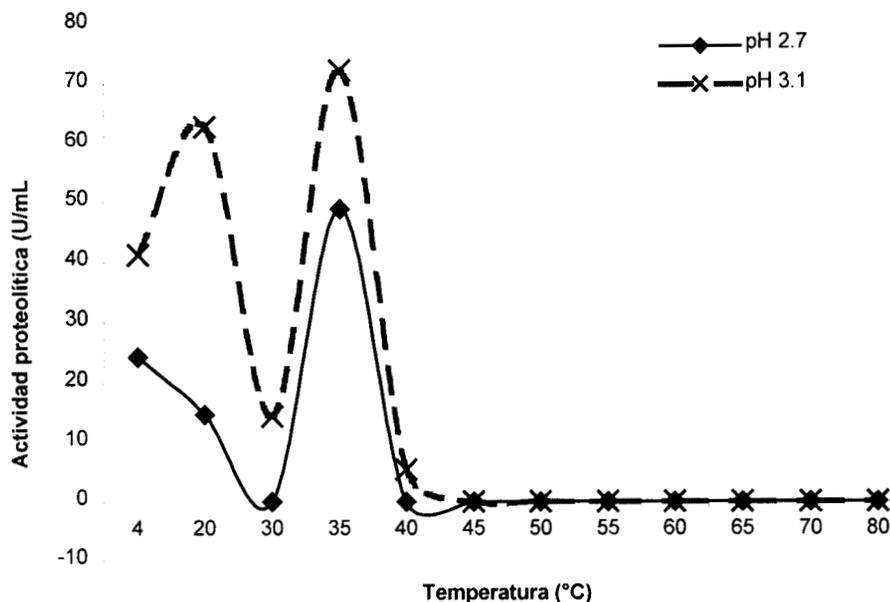


Figura 10. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica a pH.2.7 y 3.1.

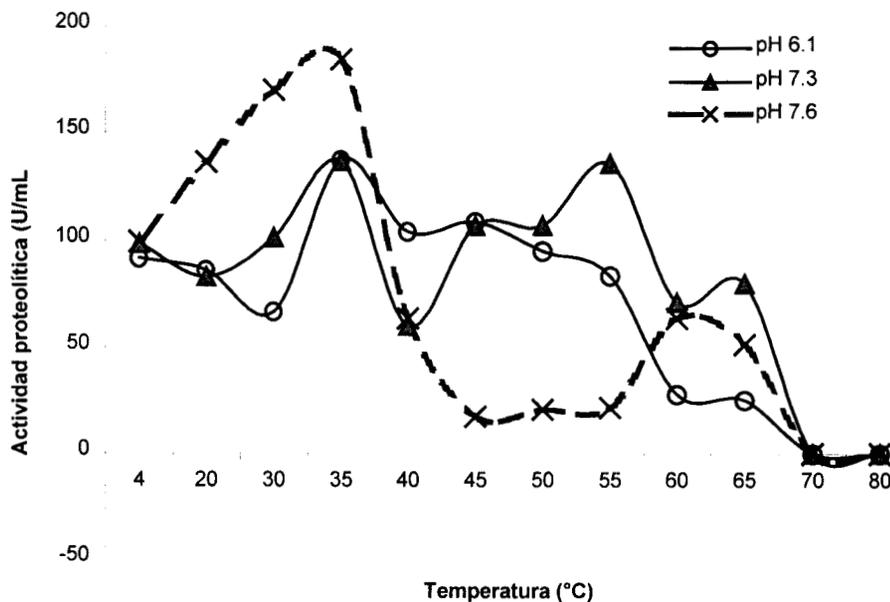


Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica a pH.6.1, 7.3 y 7.6.

Tabla 9. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (U/mL).

Temperatura °C	Grupos			
	1	2	3	4
4			71.0400	
20			76.5200	
30			70.4080	
35				115.5760
40		46.5880	46.5880	
45		46.4400	46.4400	
50		44.4320	44.4320	
55		48.5493	48.5493	
60	32.5200	32.5200		
65	31.1920	31.1920		
70	.0000			
80	.0000			

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

Sakai y col. (1981), observaron en el extracto del músculo de calamar *Ommastrephes sloani pacificus*, que la máxima actividad estuvo en un intervalo de 35 a 40°C. Asimismo Kolodziejka y col. (1995), encontraron que la temperatura óptima para el extracto enzimático del bacalao del pacífico *Gadus morhua* estaba en un intervalo de 30 a 45°C, al utilizar hemoglobina como sustrato.

El aumento de actividad a los 55 °C en el pH de 7.3, puede deberse a la presencia de enzimas cuya temperatura óptima se encuentra alrededor de esta temperatura. An y col. (1995), encontraron que la temperatura óptima para la catepsina L fue de 55°C en extracto de surimi obtenido de pescadilla del Pacífico.

La actividad a pH de 6.1 después de haber tenido una disminución de actividad a 40°C, mostró un aumento a 45°C. Kolodziejka y col. (1994), encontraron que la temperatura óptima para el extracto enzimático del hígado de calamar *Illex argentinus* fue de 45°C; asimismo

Ayensa y col. (1999), observaron que la actividad proteolítica máxima en el músculo de pota (*Todaropsis eblanae*) fue a los 45°C.

A pH 6.1, 7.3 y 7.6, se observó actividad proteolítica a los 65°C, coincidiendo con lo reportado por Ayensa y col. (1999). Las proteasas activadas por calor también influyen desfavorablemente en la calidad, causando un ablandamiento excesivo en el músculo de productos marinos. Las proteasas latentes activadas a temperaturas de 50 a 65° C, causan una rápida hidrólisis de la miosina y otras proteínas musculares durante los procesos de gelificación (Haard, 1994).

6.1.3 Determinación de pesos moleculares del extracto crudo del manto del calamar

Para llevar a cabo la determinación del perfil de pesos moleculares, se realizaron diferentes ensayos para obtener la mejor resolución, llegando a una proporción en los geles de acrilamida de T=10%.

Siguiendo la metodología descrita en la sección 6.7, se obtuvo el peso molecular de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar, utilizándose como referencia el patrón del carril II, teniéndose un intervalo de pesos moleculares de 11,000 a 395,000 Da. En la Tabla 10 se reportan los pesos moleculares obtenidos para cada una de las bandas.

Tabla 10. Pesos moleculares calculados del extracto crudo del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

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

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

6.1.4 Efecto de la adición de inhibidores proteolíticos

Para llevar a cabo la caracterización del grupo de proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar, se utilizaron los inhibidores listados en la Tabla 5.1.5, a los diferentes valores de pH indicados en la sección en 6.1, se graficó contra la actividad residual (Figuras 12 a 16).

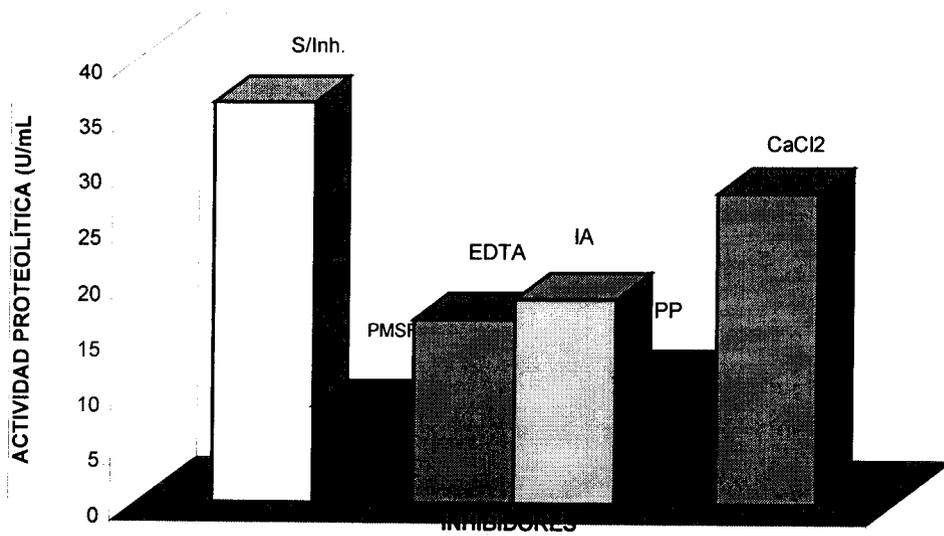


Figura 12. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 2.7.

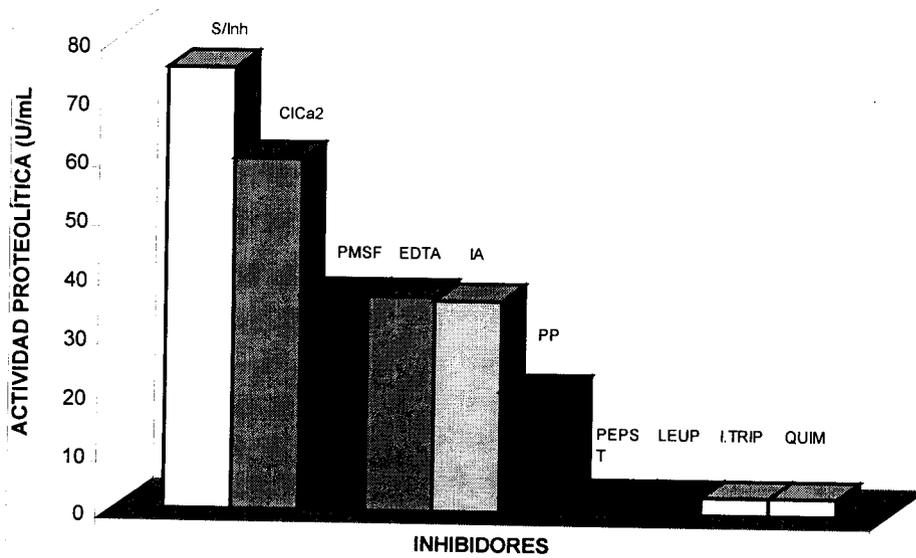


Figura 13. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 3.1.

225557

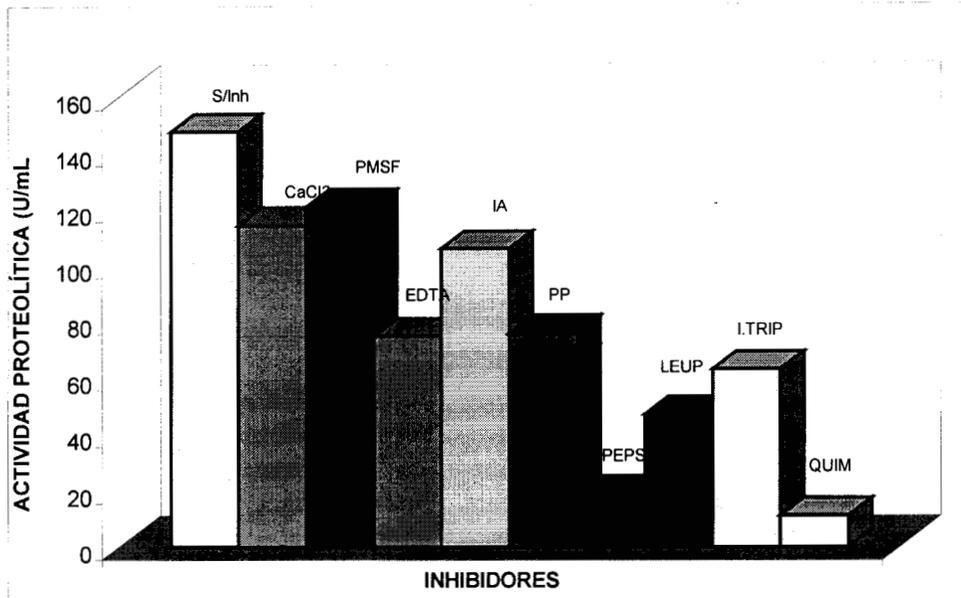


Figura 14. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 6.1.

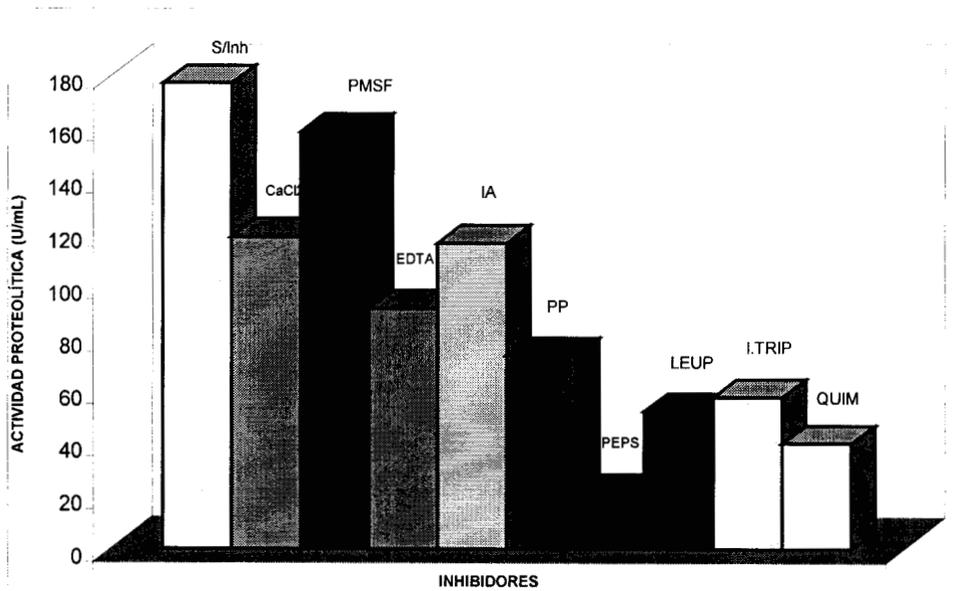


Figura 15. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 7.3.

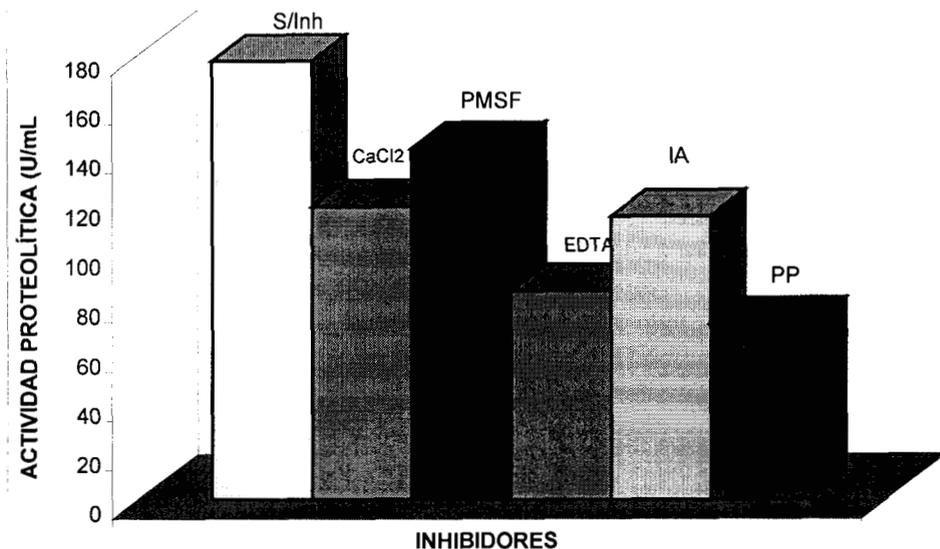


Figura 16. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a pH 7.6.

El efecto de los inhibidores pepstatina-A, inhibidor de tripsina, leupeptina, quimostatina, se llevó a cabo a pH 3.1, 6.1 y 7.3, tomando en consideración un pH ácido y otro alcalino; el resto de los inhibidores se estudió a los cinco valores de pH indicados.

El análisis de varianza mostró que hubo diferencia significativa entre los diferentes inhibidores utilizados ($P < 0.0001$). Mediante el método de comparación de medias de Duncan, se observó que pepstatinaa, quimostatina, leupeptina e inhibidor de tripsina tuvieron un efecto inhibitorio el cual disminuyó en ese orden, observándose en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de medias por el método de Duncan del efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica (U/mL).

Inhibidores	Grupos				
	1	2	3	4	5
pepstatina	17.2267				
quimostatina	23.2556				
leupeptina	39.9733	39.9733			
Inhibidor de tripsina	48.1067	48.1067			
pirofosfato		56.2267			
EDTA		67.5333	67.5333		
iodoacetamida			86.5600	86.5600	
CaCl ₂			97.4400	97.4400	
PMSF				108.5200	108.5200
Sin inhibidor					127.7378

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes $p < 0.05$.

En la Figura 17 se muestra una comparación del efecto de los inhibidores utilizados a los pH estudiados.

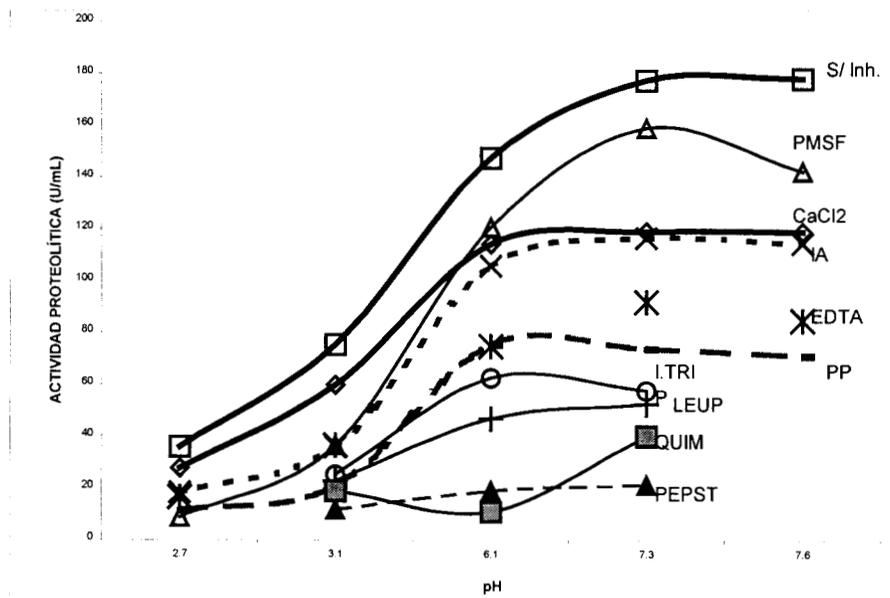


Figura 17. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica a diferentes pH.

La pepstatina-A inhibe a las proteasas aspárticas de animales tales como pepsinas, quimosinas, catepsina D y renina. La leupeptina es un inhibidor reversible para serín-proteasas, y es muy efectivo a concentraciones milimolares. La quimostatina, es un inhibidor reversible, cuya solubilidad es limitada pero es efectivo a concentraciones micromolares. Para las serín proteasas, por ejemplo la quimotripsina Al observar la Figura 17, se nota que la pepstatina A es un inhibidor muy eficiente, coincidiendo con lo reportado por Sakai y col. (1981) y Kolodziejska y col. (1994). La leupeptina, quimostatina e inhibidor de tripsina muestran también una marcada inhibición indicando que la actividad proteolítica del extracto se debe principalmente a las proteasas aspárticas.

El floruro de fenil sulfonilo (PMSF), es un inhibidor irreversible de las serín-proteasas. Como se observa en la Figura 17, éste inhibió en menor grado la actividad proteolítica a los diferentes pH estudiados, coincidiendo con los estudios de Kolodziejska y col. (1994). Los resultados muestran por lo tanto que en el extracto crudo están presentes las serín-proteasas.

El EDTA es un agente quelante en metalo-proteasas pero también puede inhibir otras proteasas tales como las cisteín-proteasas (Beyond y Bond, 1994; Ebina y col., 1995). Tanto con este inhibidor, como con la iodoacetamida la inhibición no fue notable.

El Ca^{2+} es necesario para que algunas enzimas se activen, por ejemplo las calpains (cistein proteasas). En este caso, el CaCl_2 al ser utilizado a la concentración de 5mM, redujo la actividad proteolítica, sin embargo, la disminución de ésta no fue tan notoria, comparado con los inhibidores de proteasas.

6.1.5 Purificación parcial del extracto enzimático crudo del manto del calamar gigante

En las Figuras 18 a 21, se reporta la actividad proteolítica y el contenido de proteína de las fracciones obtenidas mediante HPLC a los diferentes pH utilizados.

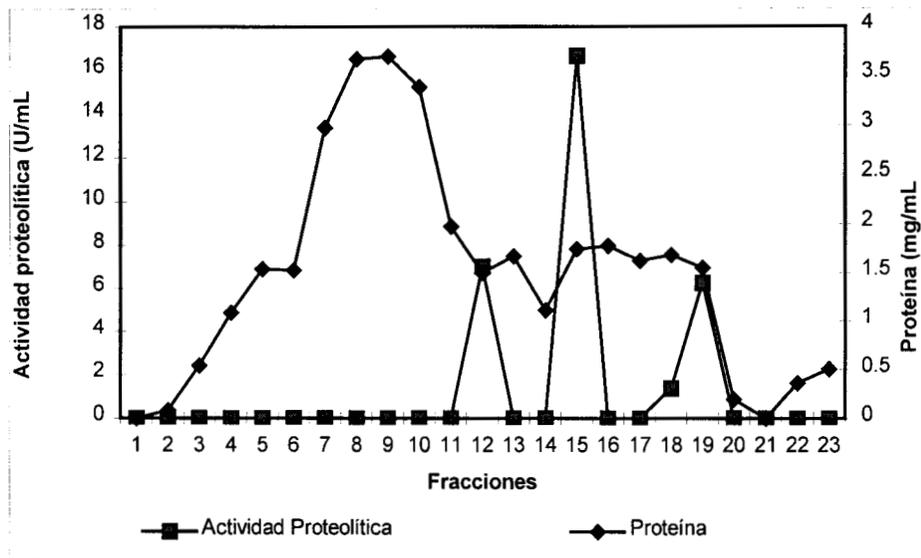


Figura 18. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 2.7. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, así como los picos de las fracciones con actividad enzimática.

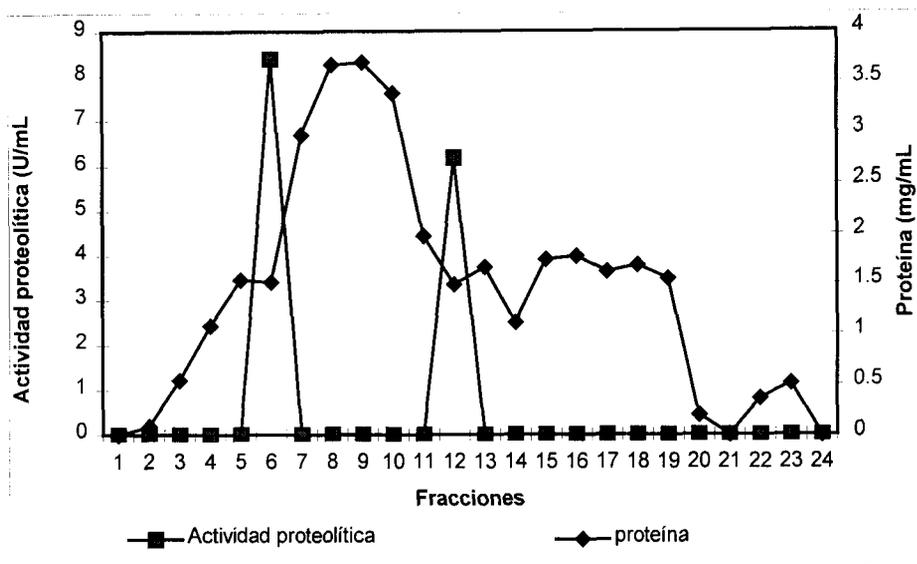


Figura 19. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 3.1. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, así como los picos de las fracciones con actividad enzimática.

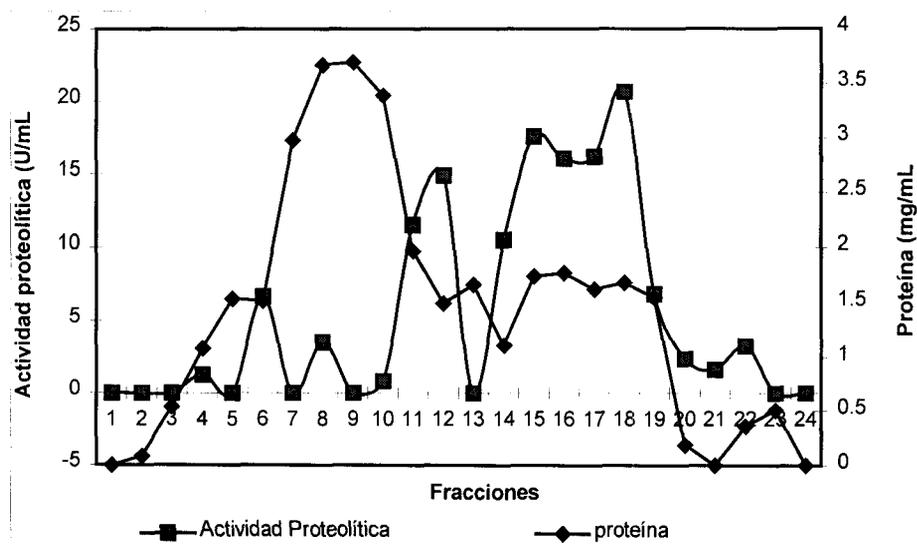


Figura 20. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 6.1. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, así como los picos de las fracciones con actividad enzimática.

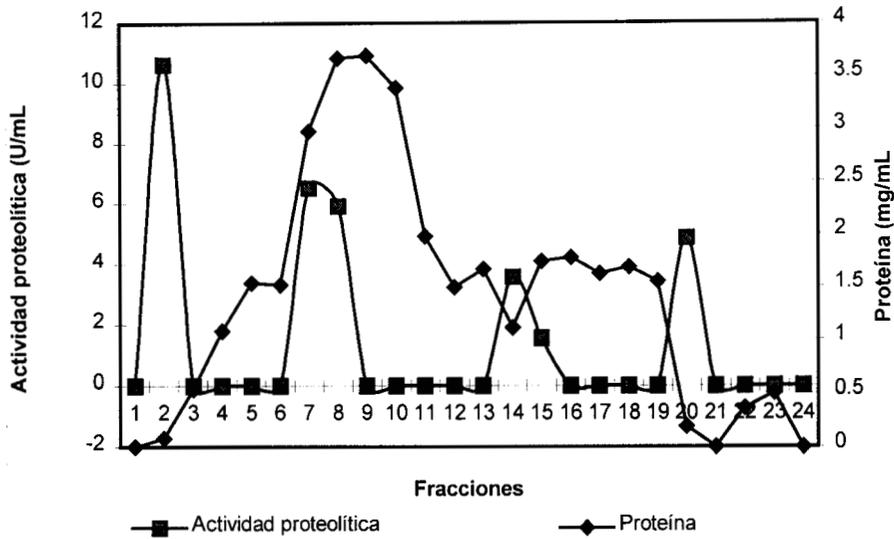


Figura 21. Cromatografía de filtración en gel HPLC, de las diferentes fracciones del extracto enzimático del manto del calamar ajustado a pH 7.3. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, así como los picos de las fracciones con actividad enzimática.

Como se puede observar no todas las fracciones obtenidas fueron activas a todos los pH analizados. La fracción 6 fue activa al pH 3.1 y 6.1. La fracción 12 fue activa a los pH 2.7, 3.1 y 6.1. La fracción 15 fue activa a pH 2.7, 6.1 y 7.3, mientras que la fracción 19 fue activa a pH 3.1 y 6.1.

El peso molecular de cada una de estas fracciones estuvo en un intervalo de 11.600 a 395.000 Da., coincidiendo con lo reportado por Eileen y Gill (1982).

Dentro del perfil de pesos moleculares se encontraron fracciones de 30.000 y 200.000 Da aproximadamente. En base a los resultados de pH de actividad así como del peso molecular de cada fracción con actividad proteolítica, podría concluirse que se trata de catepsina D y E respectivamente, (Eileen y Gill, 1982).

6.1.5.1 Determinación del perfil de pesos moleculares del extracto enzimático del manto del calamar

En la Figura 22 se muestra el perfil de pesos moleculares de las primeras 7 fracciones obtenidas mediante HPLC. Los pesos moleculares obtenidos se reportan en el Anexo V.

Como se observa, tanto en electroforesis como en filtración en gel, no se obtuvo una buena separación de las proteínas, por lo cual se llevó a cabo una separación por intercambio catiónico (HPLC, columna Waters, protein-pak CM-15HR), en la cual se inyectaron 100 μ L de extracto enzimático, con un flujo de 0.25 mL/min, utilizando como fase móvil un amortiguador de fosfatos 0.5 M, pH 5, NaCl 0.154 M. Mediante este método, se obtuvieron 12 fracciones de 1 mL cada una, a las que se les determinó su actividad proteolítica por el método de Kunitz y Anson. La evaluación del contenido de proteína se llevó a cabo por el método Bio-Rad.

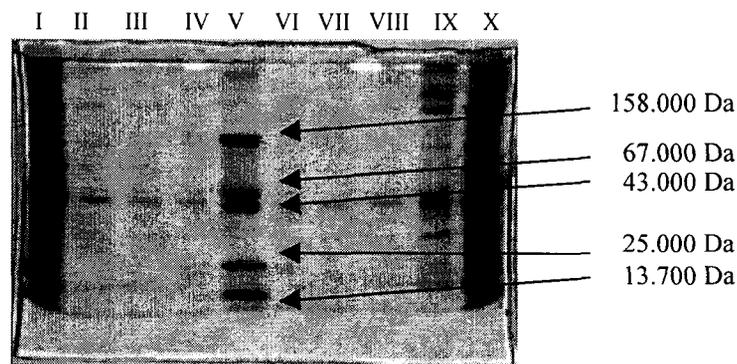


Figura 22. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%, teñido con azul de coomasie. I y X: Extracto enzimático. II a IV y VI a IX: Fracciones 1 a 7 respectivamente. V: Estándares de peso molecular conocido.

En este caso se obtuvo actividad en cuatro fracciones, a pH 2.7 en la fracción 6 y 11, a pH 3.1 y 6.1 en las fracciones 6 y 9, y finalmente a los pH 7.3 y 7.6 en las fracciones 2 y 5 (Figuras 23 a 27).

De acuerdo al perfil electroforético en las muestras obtenidas mediante Cromatograma de intercambio catiónico, hubo una mejor separación de las distintas fracciones. Los pesos moleculares se reportan en el Anexo VI.

En las Figuras 23 a 27, se muestra la actividad proteolítica y el contenido de proteína de las diferentes fracciones obtenidas mediante intercambio catiónico a los pH estudiados, así como sus respectivos pesos moleculares.

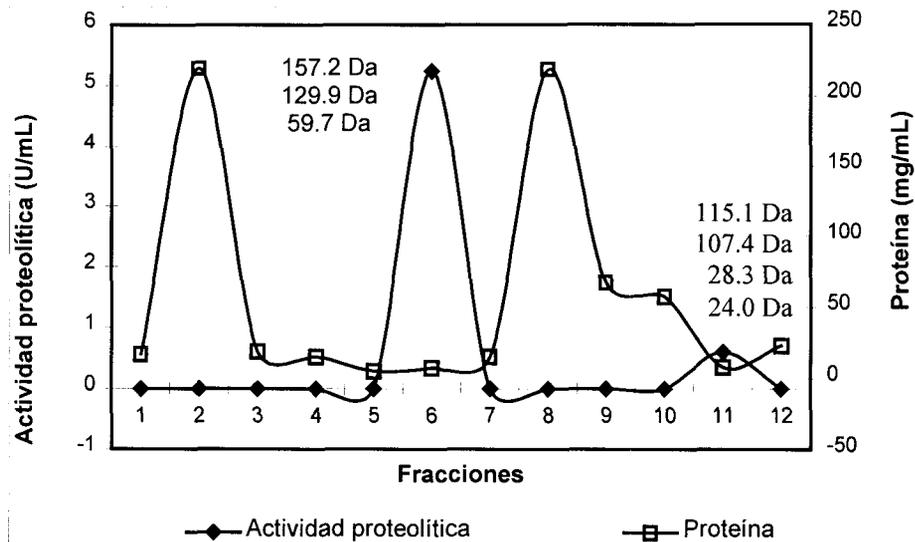


Figura 23. Cromatograma de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar, ajustado a pH 2.7. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, y los pesos moleculares de las fracciones con actividad enzimática

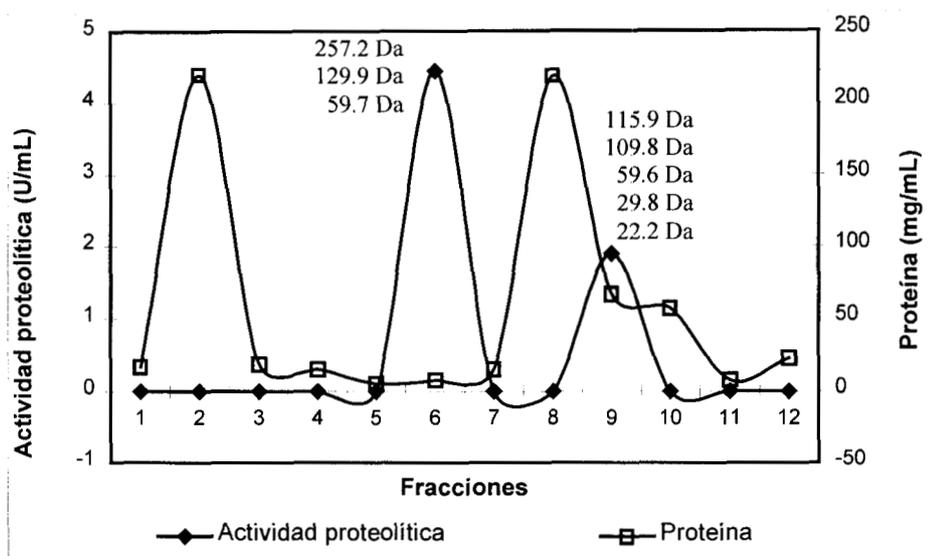


Figura 24. Cromatograma de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar, ajustado a pH 3.1. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, y los pesos moleculares de las fracciones con actividad enzimática.

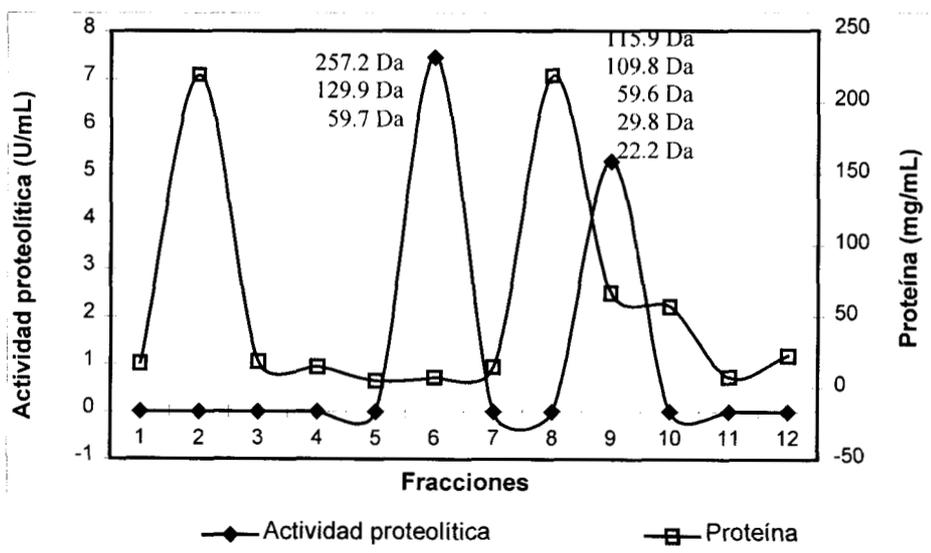


Figura 25. Cromatograma de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar, ajustado a pH 6.1. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, y los pesos moleculares de las fracciones con actividad enzimática.

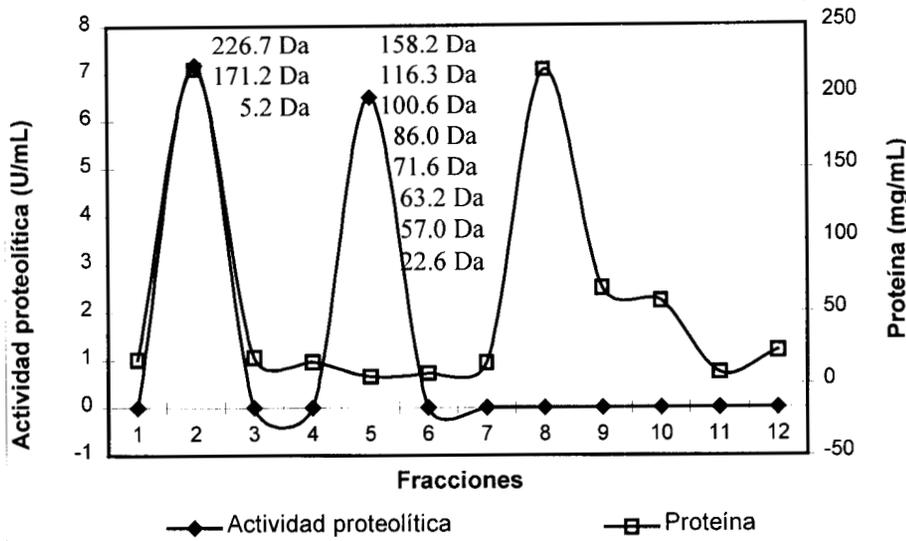


Figura 26. Cromatograma de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar, ajustado a pH 7.3. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, y los pesos moleculares de las fracciones con actividad enzimática.

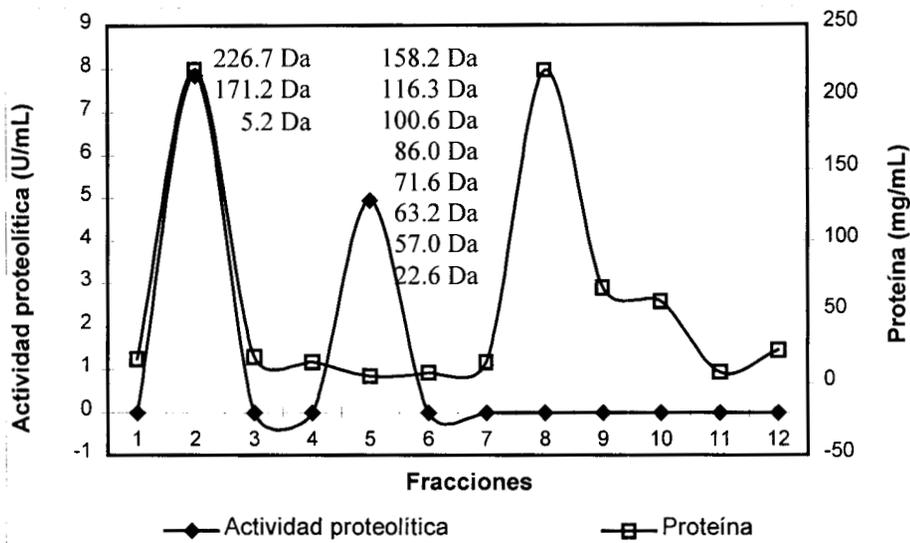


Figura 27. Cromatograma de intercambio catiónico HPLC, de las diferentes fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar, ajustado a pH 7.6. Se muestran la cantidad de proteína de cada una de éstas, y los pesos moleculares de las fracciones con actividad enzimática.

De acuerdo al peso molecular que se encontró para cada una de las fracciones, los diferentes pH de actividad y el grado de inhibición, se puede concluir que en el extracto crudo del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se encontró un conjunto de proteasas, tales como serin-proteasas, metalo-proteasas, cistein-proteasas y asparto-proteasas, de las cuales las más activas fueron las enzimas ácidas, catepsinas, ya que éstas tienen un pH óptimo de actividad en un intervalo de 3 a 5. Estas fueron inhibidas por pepstatina, leupeptina y iodoacetamida entre otros (Carballo y López, 1991; Beyon y Bond, 1994). Las enzimas encontradas podrían ser las calpainas ya que el pH óptimo de actividad está en un intervalo de 6 a 8.5 (Carballo y López, 1991; Beyon y Bond, 1994), además de que su actividad proteolítica disminuyó al utilizar inhibidores como iodoacetamida.

6.2 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

En la Figura 28 se muestra el efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica a los diferentes pH estudiados de homogeneizado almacenado a 4 °C durante ocho días.

El análisis estadístico indicó que no hubo diferencia durante los ocho días de almacenamiento, por lo cual se puede decir que al mantener el homogeneizado del manto del calamar almacenado a 4°C, las proteasas presentes en éste no pierden su actividad enzimática, por lo cual ésta puede alterar la textura del músculo durante el almacenamiento, (Ebina y col., 1995).

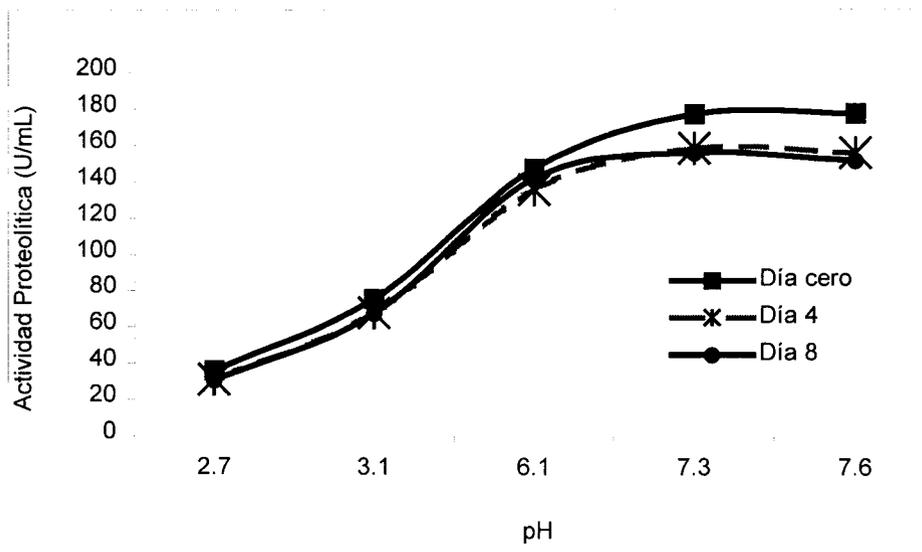


Figura 28. Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica

En la Figura 29, se muestra el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del homogeneizado del manto del calamar a través del almacenamiento, observándose que conforme pasa el tiempo hay una mayor degradación de las proteínas miofibrilares. A partir del tercer carril se observa la disminución en la concentración de la banda que se encuentra al nivel de 97,000 Da, apareciendo otras bandas de pesos moleculares menores, lo cual indicó que hubo degradación de las proteínas miofibrilares durante el tiempo de almacenamiento. Koohmaraie y col., (1984) reportaron que la α -actinina decrece durante el almacenamiento de bovino apareciendo una banda de 98,000 Da. La degradación rápida de la α -actinina puede estar relacionada a la rápida fractura de la línea Z (Rong-Ghi y col., 1995), debida a la autólisis que sufren las proteínas durante el almacenamiento.

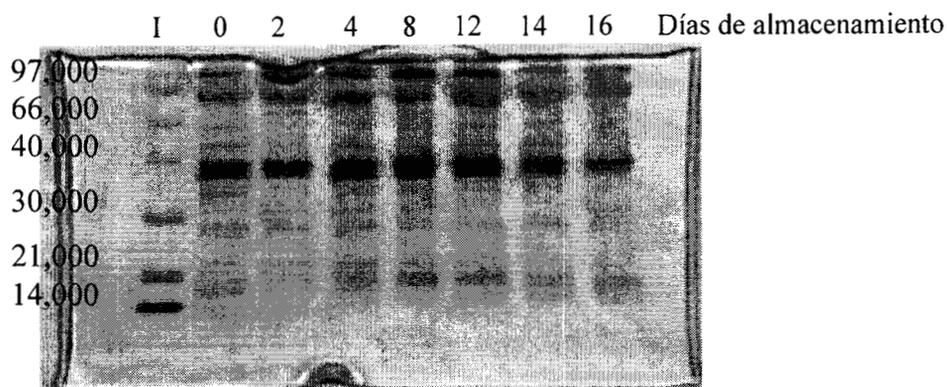


Figura 29. PAGE-SDS de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), a diferentes días de almacenamiento a 4 °C, teñido con azul de coomasie.

6.2.1. Efecto de inhibidores

Como se ha mencionado anteriormente, las proteasas presentes en el manto del calamar degradan las proteínas miofibrilares; esto puede evitarse adicionando inhibidores proteolíticos (Ebina y col., 1995). Para comprobar este efecto se midió la actividad proteolítica del homogeneizado del manto del calamar, utilizando los inhibidores referidos en la sección 5.1.4.

Al día cero, los inhibidores pepstatina A, quimostatina, inhibidor de tripsina y leupeptina mostraron una inhibición eficiente, mientras que el resto de los inhibidores tuvieron un menor efecto (Figura 30).

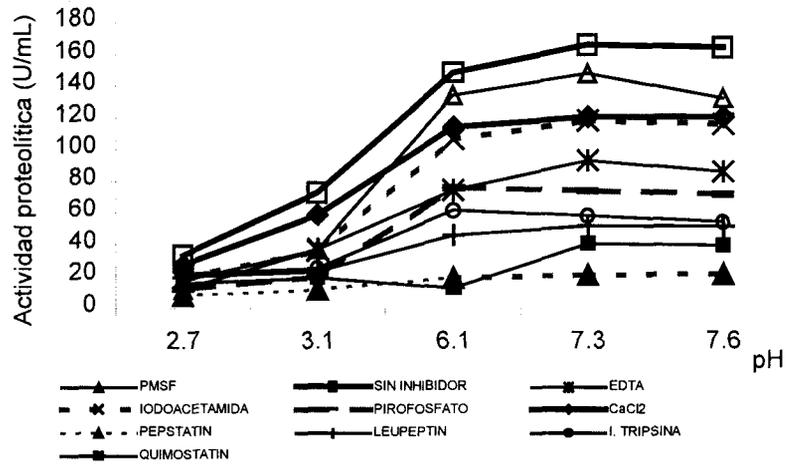


Figura 30. Efecto de inhibidores sobre actividad proteolítica del homogeneizado de músculo de calamar (día cero)

Al día tres se observó un mayor efecto inhibitorio con casi todos los inhibidores utilizados (Figura 31), ya que la mayoría inhibió más de un 50 % excepto por PMSF y CaCl₂ que inhibieron sólo un 35 y 45 % respectivamente. Los resultados de porcentaje de inhibición se reportan en el Anexo VII.

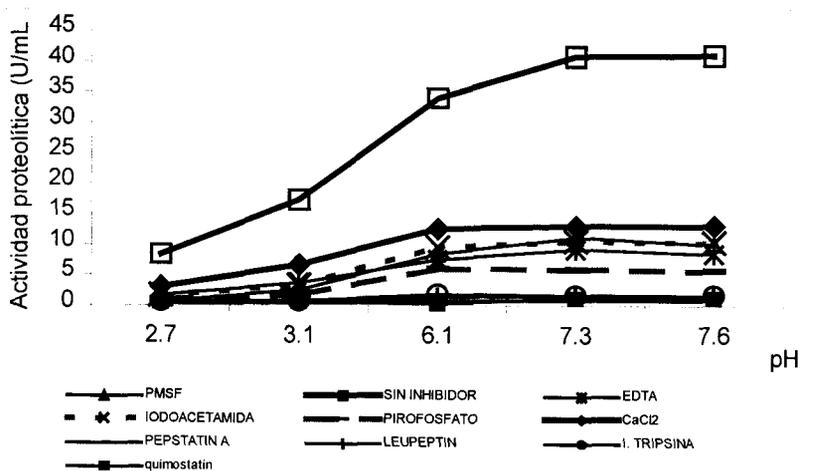


Figura 31. Efecto de inhibidores sobre actividad proteolítica del homogeneizado de músculo de calamar (día tres)

Estos resultados indicaron que al mantener almacenado el homogeneizado con los inhibidores, bajo las condiciones de estudio se puede tener un mejor control sobre las proteasas presentes en el homogeneizado del manto del calamar.

6.2.1.1 Efecto de inhibidores de proteasas sobre el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares

En la Figura 32 se muestra el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares aisladas del homogeneizado del manto del calamar después de mantenerlo un día en almacenamiento con los inhibidores adicionados, observándose en cada uno de los carriles que la actividad proteolítica se logró detener prácticamente, ya que no se observa degradación evidente de las proteínas miofibrilares, el testigo presentó cierta degradación después del almacenamiento.

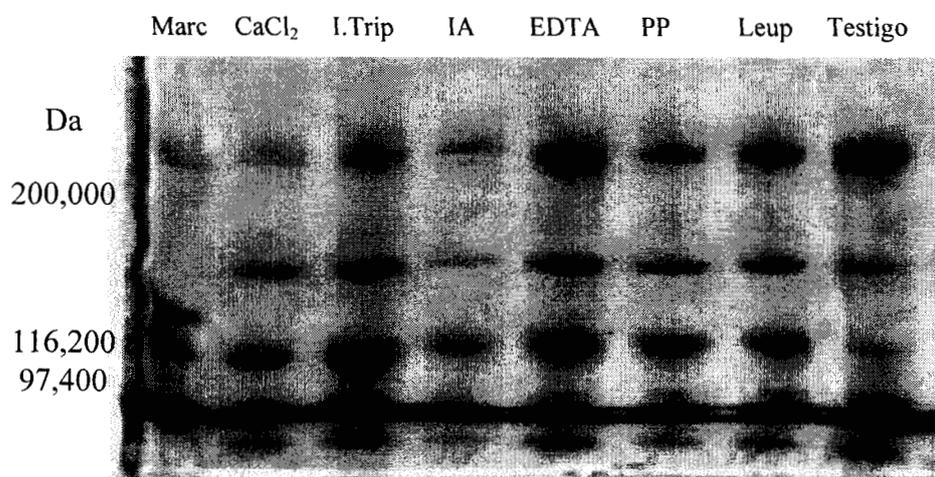


Figura 32. PAGE-SDS del efecto de inhibidores de proteasas sobre el perfil de proteínas miofibrilares del homogeneizado del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), teñido con azul de coomasie.

6.3 PARÁMETROS DE CALIDAD DEL TEJIDO MUSCULAR

El deterioro en el color y la textura, entre otros, es considerado el problema más serio especialmente cuando las prácticas de almacenamiento empleadas son deficientes, y en especial el deterioro de la calidad del músculo de los productos marinos ocurre frecuentemente durante el almacenamiento en frío, debido a los procesos hidrolíticos que sufren las proteínas y otros compuestos. (Jiang y Lee, 1985).

6.3.1 Color

El color es una de las características más importantes de la carne, ya que es el principal atributo que juzga el consumidor antes de comprar carne fresca. (Fox, 1994).

En las Tablas 14 a 16 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los parámetros de color (luminosidad, cromaticidad y tonalidad); éstos datos fueron sometidos a un análisis de varianza observándose que hubo una diferencia significativa ($P < 0.0001$), lo cual indica que durante el almacenamiento del manto del calamar hay variación en el color, coincidiendo con lo reportado por Kolodziejska y col., (1987).

El deterioro en el color y apariencia es debido a los cambios irreversibles que ocurren en las proteínas del músculo, pigmentos unidos a proteínas o en ciertas proteínas pigmentadas (Jiang y Lee, 1985). Se ha reportado que después de varios días de almacenamiento el complejo pigmento-proteína que se encuentran en el músculo, se disocia debido a la autólisis

causando la variación de color del tejido muscular. (Kolodziejska y col., 1987; Sikorski, Z.E. y Pan, B.S., 1994).

Tabla 12. Comparación múltiple de medias de Duncan de la luminosidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15.

DIA	Grupos	
	1	2
0		70.3667
4		70.5433
8	68.916	
15		70.4433

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

Tabla 13. Comparación múltiple de medias de Duncan de la cromaticidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15.

DIA	Grupos		
	1	2	3
0			5.5133
4			5.4633
8		4.7433	
15	4.6300		

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

Tabla 14. Comparación múltiple de medias de Duncan de la tonalidad del manto del calamar gigante almacenado a los días 0, 4, 8 y 15.

DIA	Grupos		
	1	2	3
0		3.5067	
4			3.5667
8	3.4367		
15	3.4433		

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

6.3.2 Textura

Los cambios indeseables en la textura, como consecuencia de un tiempo largo de almacenamiento tienen gran importancia, ya que ocurre una degradación a la calidad de la carne, particularmente en especies marinas. Se considera que la pérdida de la calidad es debida a la hidrólisis de las proteínas durante el almacenamiento (Jiang y Lee, 1985; Ebina y col., 1995). El atributo de textura en el manto del calamar es diferente a las otras especies marinas, carnes rojas y aves (Otwell y Hamann, 1979). El manto del calamar presenta una textura peculiar, debida a la estructura especial de su tejido (Kolodziejska y col., 1987).

El ablandamiento del músculo se debe principalmente a la proteólisis de proteínas miofibrilares, en particular de la troponina T y la desmina (Whipple y Koohmaraie 1991; Wheeler y Koohmaraie, 1994) a causa de las calpainas (Roncalés y col., 1995). Etherington (1984) supone que la pérdida de estos componentes pueden ser directamente responsables del rompimiento de la fibra muscular y como consecuencia el ablandamiento del músculo.

En la Figura 33 se muestran los resultados del esfuerzo al corte del manto del calamar usando la navaja Warner-Bratzler medido a los 0, 2, 4, 6 y 8 días de almacenamiento, tanto del músculo crudo como cocido.

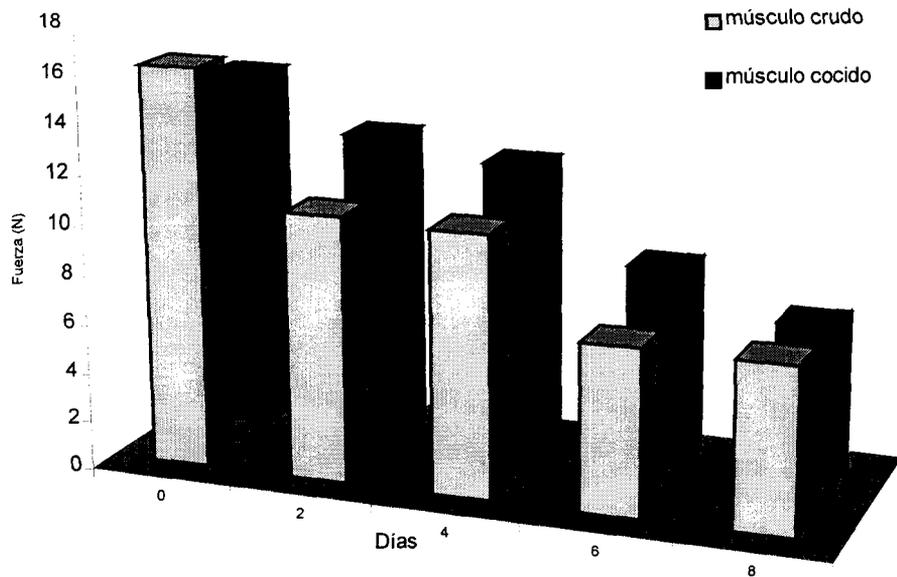


Figura 33. Cambios en el esfuerzo al corte del músculo crudo y cocido del calamar gigante almacenado a los 0, 2, 4, 6 y 8 días.

Al transcurrir el tiempo de almacenamiento, la resistencia al corte disminuyó significativamente coincidiendo con lo reportado por Ando y col., (1999), llevando a la deterioración del músculo. En músculos de productos marinos la firmeza tiene una alta correlación con el contenido de colágena, el mayor constituyente del tejido conectivo (Ochiai y col., 1985).

Kuo y col., (1991) demostraron que mientras las fibras de colágena aparentemente juegan un papel importante en las propiedades de tensión del músculo crudo del calamar, las proteínas contráctiles son relativamente más importantes después del calentamiento.

Una ruptura de la conexión entre filamentos de titina en la banda I y en el disco Z parece ser una de las causas del ablandamiento del músculo (Taylor y col., 1995), esto debido probablemente a la degradación de titina y nebulina (Ho y col., 1994; Steen y col., 1997).

La titina o conectina es degradada en péptidos pequeños durante el almacenamiento (Fritz y Greaser, 1991). Suzuki y col., (1997) sugieren que la proteólisis de α -conectina por calpains y catepsina D resulta en la formación de β -conectina (Steen y col., 1997).

Otra proteína de los filamentos intermediarios es la nebulina, la cual es degradada rápidamente en condiciones de almacenamiento (Fritz y Greaser, 1991; Greaser y Fritz, 1995) es lógico proponer que el rompimiento de una o ambas de estas proteínas *postmortem* debería modificar la estructura miofibrilar e incrementar la blandura de la carne durante el almacenamiento (Pérez y Guerrero, 1999).

Ando y col., (1999) han mostrado que después de cierto tiempo de refrigeración del manto del calamar empiezan a aparecer espacios en el tejido conectivo y en las células del músculo, esto es debido a que disminuye la integridad entre las células y como resultado se produce una caída en la resistencia al corte. De la misma manera, esta disminución ocurre por el decremento en las fuerzas de enlaces entre la membrana celular y la colágena.

Se ha reportado que la catepsina D es el principal agente en la degradación de la colágena (Weston y col., 1969).

Sakai y Matsumoto (1981) y Ebina y col., (1995) observaron que el manto del calamar tiene una elevada actividad de catepsinas B, D y L, por lo cual la degradación puede ser ocasionada por acción proteolítica, dando como resultado el ablandamiento del manto del

calamar. Cano (2001) observó degradación de cartílago en un periodo de incubación de 1 hr al utilizar extracto enzimático de calamar gigante.

Mediante el análisis estadístico se observó que el tiempo tuvo efecto significativo durante los días de almacenamiento para cada uno de estos ($P < 0.0001$). En las tablas 17 y 18 se muestra que al transcurrir el tiempo de almacenamiento, el esfuerzo al corte disminuye, debido a la autólisis que presenta el manto del calamar, rompiendo las fibras musculares, dando como consecuencia el ablandamiento de este.

Tabla 15. Comparación de medias por el método de Duncan sobre el esfuerzo al corte (N) del músculo de calamar crudo.

DIAS	Grupos		
	1	2	3
0			16.2211
2		10.7961	
4		10.6170	
6	6.8063		
8	6.7365		

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

Tabla 16. Comparación de medias por el método de Duncan sobre el esfuerzo al corte (N) del músculo de calamar cocido.

DÍAS	Grupos			
	1	2	3	4
0				14.7812
2			12.5875	
4			11.8285	
6		8.1859		
8	6.4490			

Medias dentro del mismo grupo no son significativamente diferentes.

6.3.3 Capacidad de retención de agua (CRA)

En la Figura 34, se muestra el efecto del almacenamiento que se tiene sobre la CRA en el manto del calamar gigante. Al llevar a cabo la determinación de la capacidad de retención de agua se observó que ésta aumentó durante los primeros seis días, tal vez debido a que la cantidad de agua que está inmovilizada en el interior del tejido muscular, depende de la forma en que las proteínas miofibrilares estén organizadas; es decir, de la disposición de los filamentos de actina y miosina. El entramamiento proteico está constituido por una red tridimensional de filamentos delgados y gruesos dentro de la unidad de la fibra muscular. Cuando decrece la cohesión entre los filamentos de actina y miosina, la longitud del sarcómero aumenta, lo cual facilita una mayor retención de agua (Flores y Bermell, 1984).

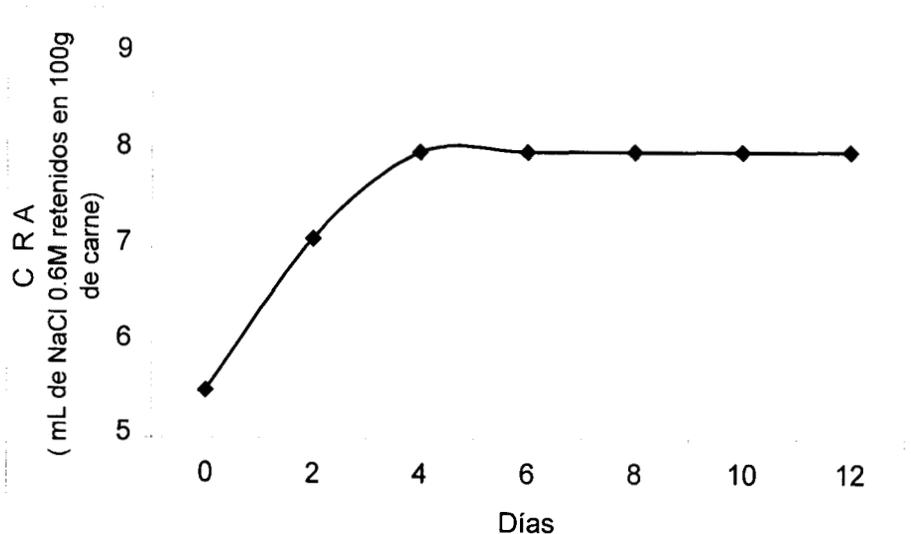


Figura 34. Efecto del almacenamiento del manto del calamar gigante sobre la Capacidad de Retención de Agua.

6.3.4 pH

En la Figura 35, se observa el efecto del almacenamiento sobre el pH. El pH aumentó durante el almacenamiento del manto del calamar, lo que sugiere que aumentaron las cargas negativas, las moléculas de proteínas se repelieron entre sí, y la matriz proteica se ensanchó. Al mismo tiempo se incrementó la fuerza de atracción eléctrica con los dipolos de agua, lo cual ocasionó una elevación de la CRA

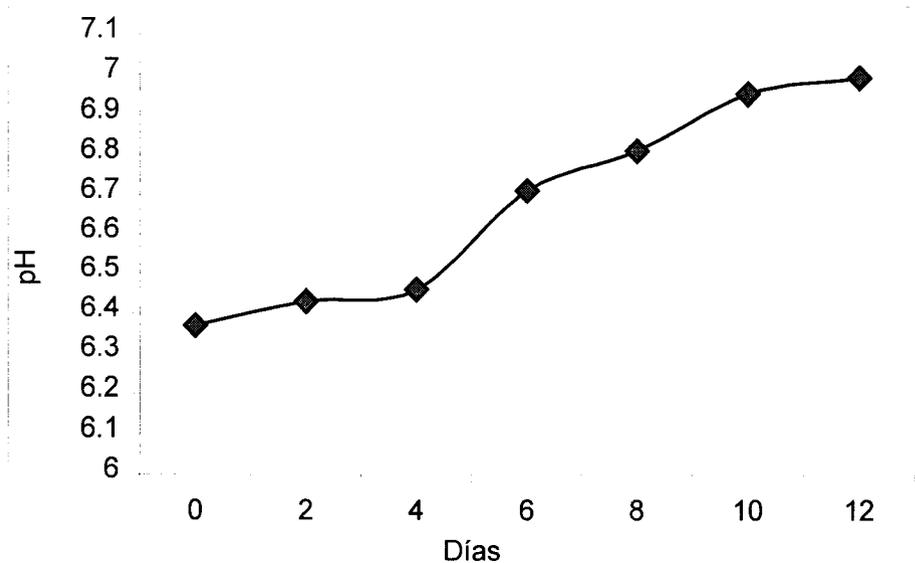


Figura 35. Efecto del almacenamiento en el pH del manto del calamar gigante.

nivel ultraestructural, las calpainas remueven rápidamente la línea Z de las miofibrillas, produciendo una fragmentación de las proteínas miofibrilares al nivel de su estructura. La separación observada de las fibras musculares pudo deberse también al debilitamiento de las fuerzas conectivas y al ablandamiento del músculo del calamar durante la refrigeración (Ando y col., 1999). La desintegración de las fibras de la colágena se atribuye al propio proceso de ablandamiento (Sato y col., 1997), asimismo a la actividad de la catepsina D (Weston y col., 1969; Zeece y col., 1986; Zeece y Katoh, 1989).

Se cree que las proteasas propias del músculo iniciaron la degradación de las proteínas miofibrilares (Carballo y López, 1991), siendo principalmente la troponina I y la troponina T, degradadas por las calpainas (Di Lisa y col., 1995) produciendo fragmentos de peso molecular bajo con un intervalo de 27,000 a 30,000 Da (Robson y col., 1997), lo cual es un indicador del grado de proteólisis (Steen y col., 1997) lo que se traduce en un ablandamiento en el músculo durante su almacenamiento (Oliveira, 1998).

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

Al día 9 (Figura 39), se observó que las células musculares están más separadas y desorganizadas esto debido probablemente a la degradación de las mismas proteínas miofibrilares antes mencionadas, así como también a la degradación de la desmina. Se ha reportado que la destrucción de esta proteína causa la reducción en el alineamiento del

sarcómero de las miofibrillas, lo cual ocurre durante el almacenamiento (Greaser y Fritz, 1995), asimismo a la catepsina D, la cual ha sido una de las enzimas más estudiadas en relación con su efecto sobre la degradación de tejido muscular (Zeece y col., 1986; Zeece y Katoh, 1989) en particular su habilidad para degradar la miosina (ambas cadenas, ligeras y pesadas), la actina y las proteínas del complejo regulatorio (la tropomiosina y troponina T e I). Del mismo modo Ouali y col., (1987) observaron que las proteínas miofibrilares fueron hidrolizadas por las catepsinas B, D y L, causando también degradación en la línea Z y bandas M.

Con lo mencionado anteriormente, se observó que la pérdida significativa de la calidad es causada por la degradación enzimática, tanto de la colágena como de las proteínas miofibrilares en el tejido crudo, durante el almacenamiento, lo cual coincide con lo reportado por Kolodziejaska y Zicorski, 1996; Oliveira, 1998. Todo esto se relaciona también con el efecto del aumento del pH y de la capacidad de retención de agua, ya que al haber un aumento de estos con respecto al tiempo de almacenamiento, hay un aumento en el contenido de agua de las miofibrillas, esto conlleva una desintegración de la estructura miofibrilar en la banda I. La pérdida de integridad de la línea Z permite la entrada de más moléculas de agua en la red y consecuentemente un aumento en la CRA (Pedersen, 1994), observándose a nivel microscópico una separación y elongamiento de las miofibrillas, esto aunado al aumento de pH.

En general todos los cambios en la integridad se refleja en pérdida de textura medida como reducción en el esfuerzo al corte y aumento de la CRA.

CONCLUSIONES

-
- Al evaluar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto crudo del manto del calamar gigante, se observaron cinco valores de pH en donde la actividad fue máxima; dos para las enzimas ácidas (pH de 2.7 y 3.1), y tres para las enzimas neutras (pH de 6.1, 7.3 y 7.6).
 - Se confirmó, que la temperatura óptima de actividad proteolítica a la cual se obtuvo un máximo para todos los pH fue de 35 °C.
 - El perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar indicó que éstas tienen pesos moleculares en un intervalo de 11,000 a 395,000 Da, lo cual coincide con el peso molecular para algunas proteasas.
 - Para la purificación parcial de las proteasas del extracto crudo del manto del calamar se obtuvo una mejor separación al utilizar una columna de intercambio catiónico, que una de filtración en gel, ya que en la primera se pudieron observar mejor las diferencia entre los pesos moleculares de las distintas fracciones. En la filtración en gel se obtuvo un intervalo de pesos moleculares de 11,000 a 365,000 Da, y para el intercambio catiónico el intervalo fue de 6,500 a 216,000 Da. Por lo cual se recomienda para estudios posteriores utilizar una columna de intercambio catiónico.
 - De los distintos inhibidores que se probaron, la leupeptina, inhibidor de tripsina, la quimostatina y la pepstatina que tuvieron un mayor efecto inhibitorio mientras que EDTA, CaCl₂, PMSF, iodoacetamida y pirofosfato no propiciaron una inhibición significativa.

-
- De acuerdo al peso molecular de cada una de las fracciones obtenidas, los diferentes pH de actividad, y el efecto de los distintos inhibidores, se puede concluir que en el extracto crudo del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se encuentran un conjunto de proteasas, tales como serin-proteasas, metalo-proteasas y cistein-proteasa, entre otras, de las cuales las más activas fueron las catepsinas, (proteasas ácidas). Estas tuvieron un pH óptimo de actividad en un intervalo de 3 a 5, y un peso molecular de 42,000 Da. Las proteasas neutras más activas fueron las calpainas, con un pH óptimo de actividad en un intervalo de 6 a 8.5, y dos subunidades con pesos moleculares de 30,000 y 80,000 Da, así como tripsina con un pH óptimo en un intervalo de 7-9.

 - La evaluación de los parámetros de calidad, aunados con los estudios de Microscopía Electrónica de Barrido, mostraron que durante el almacenamiento del manto del calamar gigante ocurre una degradación evidente, ya que se observó una variación en cuanto al color, y la resistencia al corte disminuyó significativamente. Las micrografías mostraron la degradación del músculo durante el almacenamiento, todo esto da un indicio de que las enzimas endógenas que se encuentran en éste, tienen un papel fundamental en la degradación de la textura.

 - Ya que en este trabajo se ha demostrado que la calidad del manto del calamar gigante es alterada por las enzimas proteolíticas presentes en éste, y dado que los inhibidores utilizados no son permitidos por la legislación alimentaria, se recomienda para trabajos posteriores, utilizar métodos alternos para llevar a cabo la inactivación de las enzimas, como control del pH y temperatura, así como la utilización de altas presiones, procurando

no afectar tanto sus características organolépticas como las de calidad. Asimismo es necesario llevar a cabo estudios más específicos sobre actividad de las colagenasas, ya que como se ha mencionado son una de las responsables en la degradación del colágeno dando como resultado el ablandamiento del músculo del calamar durante el almacenamiento. Es necesario también realizar estudios de microscopía a nivel estructural para poder identificar las estructuras proteicas degradadas por las proteasas.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, R.A. y Dransfield, E. 1990. Acceleration of proteolysis in beef by addition of calcium ions. Proceedings 36th. International conference of meat and technology. La Habana, Cuba. pp 179-185.

An, H., Peters, M.Y., Seymour, T.A. y Morrissey, M.T. 1995. Isolation and activation of cathepsin I-inhibitor complex from pacific whiting (*Merluccius productus*). *J. Agric. Food Chem.* 43, 327-339.

Ando, M., Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., y Miyoshi, M.1999. Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness. *J. Food Sci.* 64:659-662.

Ashie, I.N.A. Simpson, B.K. y Ramaswam, Y., H.S. 1996 Control of endogenous enzyme activity in fish muscle by inhibitor and hydrostatic pressure using RMS. *J. Food Sci.* 61:350-356.

Ayensa M. G., An, H. Gómez, G. M. C., Montero, P. y Borderías, A. J. 1999. Partial protease activity characterization of squid (*Todaropsis eblanae*) mantle. *Food Sci. Tech. Int.*, 5:391-396.

Baduí, D.S. 1999. Química de alimentos. Edit. Pearson Educación. 3^a edición. México. pp 135-142.

Bandman, E. 1994. Química de los tejidos animales. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Zaragoza, España. Editor James F. Price. Edit. Acribia pp 11-58.

Beyond, R.J. y Bond, J.S. 1994. Proteolytic Enzymes, A practical approach. Edit. Oxford University Press. New York. pp 1-46.

Bratzler, L.J. 1949. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. *Proc. Recip. Meat Conf.* 2:117-121.

Burton, M. y Burton, R. 1979. Purnell's encyclopedia of animal. Edit. Bruguera. USA.

Cano, M.A. 2001. Determinación de actividad proteolítica de proteasas animales y vegetales sobre sustratos relacionados con enfermedades auto inmunes. Servicio Social Ingeniero Bioquímico. La Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. pp 5-15.

Carballo, B. Y López De T. 1991. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Edit. Madrid Vicente, España. pp 1-60.

Careche, M., Herrero, A.M., Rodríguez-Casado, A., Del Mazo, M. L., y Carmona, P. 1999. Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: effects of freezing and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 46, 952-959.

Cassens, R.G., 1994 La estructura del músculo. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Zaragoza, España. Editor James F. Price. Editorial Acribia pp 11-55.

Cendero, L. 1971. Zoología Hispanoamericana-Invertebrados. Edit. Alhambra. Zaragoza, España. pp 58-76.

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

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

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

De la Rosa, M., Silva, J.T., García, T.V.M. y García, P.S. 1992. El calamar una pesquería en desarrollo. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (Inédito).

Deng, J.C. 1981 Effect of temperature on fish alkaline protease, protein interaction and texture quality. *J. Food Sci.* 46:62-65.

Di Lisa, F., De Tullio, R., Salamino, F., Barbato, R., Melloni, E., Siloprandi, N., Schiaffino, S. y Pontremoli, S. 1995. Specific degradation of troponin T and I by m-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *J. Biochem.* 308:57-61.

Doumit, M.E., Lonergan, S.M. Arbona, J.R., Killefer, J. y Koohmaraie, M. 1996. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of skeletal muscle calpastatin. *J. Anim. Sci.* 74:2679-2686.

Dransfiel, E., Etherington, D.J. y Taylor, M.A.J., 1992. Modelling *postmortem* tenderization enzyme change during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Sci.* 31:75-84.

Ebina, H., Nagashima, Y., Ishizaki, S. y Taguchi, T. 1995. Myosin heavy chain-degrading proteinase from spear squid muscle. *Food Res. Intern.* 28:31-36.

Ehrhardt, N.M., Jacquemin, P.S., Solis, N.A., García, B.F., González, D. G., Ortiz, C.J. y Ulloa, R.P. 1982a. Crecimiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en le Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia pesquera* 3:33-39.

Ehrhardt, N.M., Jacquemin, P.S., González, D. G., Ulloa, R.P., García, B.F., Ortiz, C.J. y Solis, N.A. 1982b. Descripción de la pesquería del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, flota y poder de pesca. *Ciencia pesquera* 3:41-60.

Ehrhardt, N.M., Solis, N.A., Jacquemin, P.S., Ortiz, C.J. Ulloa, R.P., González, D. G., García, B.F. 1986. Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia pesquera* 5:63-76.

Eileen, L. L. y Gill, T.A. 1982 Comparative study of proteolysis in short-finned (*Illex Illecebrosus*) and long-finned (*Loligo peali lesur*) squid. *Compl. Biochem. Physiol.* 73B:201-210.

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

Etherington, D.J., Taylor, M.A.J. y Dransfield, E. 1987. Conditioning of meat from different species. Relationship between tenderizing and the levels of cathepsin B, Cathepsin L, calpain I, calpain II and beta-glucorinase. *J. Meat Sci.* 20:1.

Flores, J. y Bermell, S. 1984a. Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares. *Rev. Agroquim. Tecnol. Alim.* 24:140-150.

Flores, J. y Bermell, S. 1984b. Propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares: capacidad de retención de agua. *Rev. Agroquim. Tecnol. Alim.* 24:151-158

Fox, J.B. 1994 Los pigmentos de la carne, En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Editado por James F. Price, Ph.D. Zaragoza, España. p 175.

Fritz, J.D. y Greaser, M.L. 1991. Changes in titina and nebulin in *postmortem* bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J. Food Sci.* 56:607-615.

García, C. F. L., Dimes, L. E. y Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytic. Biochem.* 214, 65-69.

Gómez, G. C., Solas, T., Borderías, A.J., y Montero, P. 1996. Ultraestructural and rheological changes during gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Z. Lebensm-Unters-Forsch.* 202:215-220.

Gómez, G. M.C. 1998. Thermally induced aggregation of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle proteins. Physicochemical contribution of added. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3440-3446.

Gornall A. J., Bardawill C. J., y David M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.

Greaser, M. L. y Fritz, J. D. 1995. *Postmortem* changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture. *Ecceamst.* pp 293-309.

Haard, N. F. 1994. Protein hidrolisis in seafoods. En *Seafood. Chemistry, processing technology & quality.* Edited by F. Shahidi & J.R. Bolta. Blackie Academic & Professional. pp. 10-27.

Hameed, K.S. and Haard, N.F. 1985. Isolation and characteritacion of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. *Compl. Biochem. Physiol.* 82B(2): 241-246.

Hamm, R. 1975. Water holding capacity of meat. En *Meat.* Editores D. J. A. Cole y R. A. Lawrie. Butterworths. Londres, Reino Unido. pp 321-337.

Hernández, H.A., Morales, E., Nevárez,M.O., Balmori, A. y Rivera, G.I. 1996. Distribución de tallas y aspectos reproductivos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*, D'Orbigny, 1835) en el Golfo de California, México. *Ciencia pesquera* 12:85-89.

Ho, C.Y., Stromer, M.H. y Robson, R.M. 1994. Identification of the 30 kDa polypeptide in *postmortem* skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. *Biochem.* 76:369-375.

Hultin, H. O. 1993. Características del tejido muscular. En: Química de los alimentos. Director Fennema, O. R. Zaragoza España. pp 815-888.

Hurtado, J. L., Borderías, J. y Montero, P. 1999. Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *J. Food Biochem.* 23, 469-483.

Jaarseld, 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 proteasas and cathepsins B, H, L, and D of ostrich skeletal muscle. *Meat Sci.* 45:517-529.

Jiang, S.T. y Lee, T.C. 1985. Changes in free amino acids and protein denaturation of fish muscle during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 3:839-844.

Johnson, M.H., Calkins, C.R., Huffman, R.D., Jonson, D.D. y Hargrove, D.D. 1990. Difference in cathepsin B+L and calcium dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. *J. Anim. Sci.* 68:2371

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

Kantha, S.S., Watabe, S. y Hashimoto, K. 1990. Comparative biochemistry of paramyosin- a review. *J. Food Biochem.* 14, 61-88.

Kawashima, A., Morimoto, S., Suzuki, A. Shiraishi, F. y Ohtsuki, I. 1995. Troponin isoform dependent pH dependance of the Ca^{2+} activates myofibrillar ATPase activity of avian slow and fast skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 207:585-592.

Kendall, T.L., Koohmaraie, M., Arbona, J.R. Williams, S.E. y Young, L.L. 1993. Effect of pH and ionic strength on bovine m-calpain and calpastin activity. *J. Anim. Sci.* 71:96-104.

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

Kolodziejka, I., Marcinkowska, A. y Karamac, M. 1995. The proteolytic activity of the crude enzyme extracts of baltic cod (*Gadus morhua*) alimentary tract. *J. Food Sci. Technol.* 30, 159-166.

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

Kolodziejka, I., Sikorski, Z. E. y Sadowska, M. 1987. Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influence by specimen characteristics and treatments. *J. Food Sci.* 52:932-935.

Kolodziejka, I., Szyc, E., Marramac, M. y Sikorski, Z.E. 1994 Proteolytic activity of crude enzyme extract of squid *Illex argentinus* liver. *J. Food Biochem.* 18:43-53.

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

Koohmaraie, M. 1990. Quantification of Ca^{2+} dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *J. Anim. Sci.* 70:3071.

Koohmaraie, M. 1992. Effect of pH, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. *J. Anim. Sci.* 70:3071-3080.

Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Sci.* 43:S193-S201.

Koohmaraie, M., Kennick, W. H., Elgasim, E. A., y Anglemier A.F. 1984. Effects of *postmortem* storage on muscle protein degradation: analysis by SDS-polyacrilamide gel electroforesis. *J. Food Sci.* 49:292-296.

Koohmaraie, M., Seideman, S.C., Scholmeyer, J.E., Dutson, T.R. y Babiker, A.S. 1988. Acceleration of *postmortem* tenderization in ovine carcasses through activation of Ca dependent proteases. *J. Food Sci.* 53:1638-1643.

Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II General properties. *J. Gen. Physiol.* 30:291-310.

Kuo, J. D., Hultin, H. O., Atallah, M. T. y Pan, B. S. 1991. Role of collagen and contractile elements in ultimate tensile strength of squid mantle. *J. Agric. Food Chem.* 39:1149-1154.

Lawrie, R. A. 1985. *Meat Sci.* Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall. London. pp 91-158.

Leblanc, E. L. Y Gill, T. A. 1982. Comparative study of proteólisis in short-finned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealei leseur*) squid. *Compl. Biochem. Physiol.* 73B, 201-210.

Lindsay, R. C. 1993. Flavor. En: Fennema, O. R. Química de los alimentos. pp 660-706.

Little, A.C., 1976 Physical measurements as predictors of visual appearance. *Food Technol.* 30:74.

López, L.R.F., 1984. Elaboración de un embutido tipo salchicha a base de calamar (*Dosidicus gigas*). Tesis Licenciatura Médico Veterinario Zootecnista. UNAM.

Makinodan, Y., Yokoyama, Y., Konoshita, M. y Toyohara, H. 1982. Characterization of an alkaline proteinase of fish muscle. *Compl. Biochem. Physiol.* 87B, 1041-1046.

Maruyama, K., Murakami, F. y Ohashi K. 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem.* 82:317-337.

Mitchell, H. H., Zimmerman, R. L. y Hamilton, Y. S. 1927. The determination of the amount of connective tissue in meat. *J. Biol. Chem.* 71, 379.

Murray. P.D.1990 Maintaining Protein Stability. Guide to protein. En *Methods in Enzymology*. Edited by Murray P. Deutscher Edit. Academic Press. Vol. 182. 83-89.

Nagashima, Y., Ebina, H., Nagai, T., Tanaka, M., y Taguchi, T. 1992 Proteolysis affects termal gelation of squid mantle muscle. *J. Food Sci.* 57, 916-917/922.

Navarro, V. D. E. 1999. Estudio De la formación de dimetilamina y formaldehído en el tejido muscular de organismos marinos por efecto de la congelación. Servicio social. UAM-I.

Nesis, K.N. 1970. The biology of giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*. 10:108-118.

Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S., y Hashimoto, K. 1985. Heat-induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. *J. Food Sci.* 50:981-984.

Okamoto, Y., Fuchino, O., Horiuchi, S., Tamaya, T., Matsumoto, J.J., y Tsuchiya, T. 1993. Purification and characterization of two metalloproteinases from squid mantle muscle, myosinase I and myosinase II. *Biochem. Biophys. Acta.* 1161:97-104.

Oliveira, C. 1998. Guía didáctica. Deterioro del pescado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Instituto de investigaciones pesqueras.

Otwell, W., S. y Hamann, D. D. 1979. Textural characterization of squid (*Loligo pealei* LESUER): Scanning electron microscopy of cooked mantle. *J. Food Sci.* 44, 1692-1636/1634.

Ouali, A., Garrel, N., Obled, A., Deval, C. y Valin, C. 1987. Comparative actino of cathepsin D, B, H, L and of new lysosomal cystein proteinase On rabbit myofibrils. *Meat Sci.* 19:83-100.

Ouali, A. y Valin, C. 1980. Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase myofibrillar ATPase activity relationship with ageing changes. *Meat Sci.* 5-233

Owen, J. E., Nuñez, F. A., Arias, M. T. y Cano de los Ríos O. 1982. Manual de prácticas de cursos de tecnología de la carne. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua.

Paredi, M. E. y Crupkin, M. 1997. Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (*Illex argentinus*) at different maturation stages. *J. Agric. Food Chem.* 45:1629-1632.

Paredi, M. E., Davidovich, L.A. y Crupkin, M. 1999. Thermally induced gelation of squid (*Illex argentinus*) actomyosin. Influence of sexual maturation stage. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3592-3595.

Pearson, A. M. 1963. Objective and subjective measurements for meat tenderness. En proceeding meat tenderness Symposium. Campbell Soup Co., Camden NJ.

Pedersen, J.W. Química de los tejidos animales, Parte V, Agua. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Zaragoza, España. Editor James F. Price. Edit. Acribia pp 125-171.

Penny, I.F. y Dransfield, E. 1979, Relationship between toughness and troponin T In conditions beef. *Meat Sci.* 3: 135-141.

Pérez Ch. M.L. y Guerrero, L. I. 1999. Las calpains y su efecto sobre la estructura miofibrilar. Una revisión. *Industria cárnica Latinoamericana.* 115, 47-53.

Pérez, Ch. M.L. Efecto de las calpains sobre las propiedades fisicoquímicas, ultraestructurales y sensoriales de carne roja. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. UAM-Iztapalapa.

Pérez, Ch. M.L. y Alarcón, R. A. D. 1996. Enzimas que participan en el ablandamiento de la carne. Papel de las proteasas en el músculo. *Industria cárnica Latinoamericana.* 103, 35-40.

Pérez, Ch., M. L., Guerrero, L. I. y Ponce A. E. 2000. Estructura del músculo y conversión en carne. En: Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica. Editado por: Rosmini, M.R., Pérez-Alvarez, J.A. y Fernández-López J. pp 11-21.

Ponce, A.E., Castellanos, C., Morales, R., Shirai, K. y Guerrero, I. 1999. Isolation and characterization of proteinases from Giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *IFT Annual Meeting.* P 36.

Ponce A. E., Pérez, Ch., M. L. y Guerrero, L. I. 2000. propiedades funcionales de la carne. En: Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica. Editado por: Rosmini, M.R., Pérez-Alvarez, J.A. y Fernández-López J. pp 43-50.

Price, J. F. y Schweigert B. S. 1994. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Editado por James F. Price. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Reedy, A.S.N., Safadi, F., Beyette, J.R. y Mykles, D.L. 1994. Calcium dependent proteinase activity in root cultures of arabidopsis. *Biochem. Bioph. Res.* 199:1089-1095.

Ritchey, S.J. y Cover, S. 1962, The determination of collagen in raw and cooked beef from two muscles by alkali-insoluble autoclave-soluble nitrogen and by hydroxyproline content. *J. Agric. Food Chem.* 10, 40

Robson, R.M., Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C.Jr., Ho, C.Y., Stromer, M.H., Huiatt, T.W., Bellin, R.M. y Seinett, S.W. 1997. *Postmortem* changes in the myofibrillar and other cytoskeletal proteins in muscle. *Proc. Recip. Meat Conf.* 50:43-52.

Rodger, G., Weddle, R. B., Craig, P. y Hastings, R. 1984. Effect of alkaline protease activity on some properties of comminuted squid. *J. Food Sci.* 49:117-123.

Roncalés, P., Geesink, G.H., Van Laack, R.L.J.M., Jaime, I., Beltrán, J.A., Barnier, V.M.H. y Smulders, F.J.M. 1995. Meat tenderization: enzymatic mechanism. En: Expression of tissue proteinases of protein degradation as related to meat quality. Editores Ouali, A., Demeyer, D.I. y Smulders, F.J.M.

Rong-Gui, R. C., Lin, K. J., Tseng, T. F., y Wu Ch. 1995. *Post-mortem* changes in goose (*Anser anser*) breast muscles as affected by calcium chloride marination. *J. Sci. Food Agric.* 68:293-297.

Saido, T.C., Sorimachi, H. y Suzuki, K. 1994. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8:814-821.

Sakai, J., Sakaguchi, Y. y Matsumoto, J.J. 1981 Acid proteinase activity of squid mantle muscle: some properties and subcellular distribution. *Comp. Biochem. Physiol.* 40:791-794.

Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Ohsuki, K., y Kawabata, M. 1997. Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *J. Agric. Food Chem.* 45: 343-348.

Secretaría de Pesca. Instituto Nacional de la Pesca. 1992. Programa Nacional de Calamar en el Pacífico Mexicano. Informe técnico.

Selvaraj, P., Jasmin, G.L. y Jeyachandran, P. 1992 Effect of polyphosphate dip treatment on frozen storage of indian squid *Loligo duvaureli orbigny*. *J. Food Sci. Technol.* 29:248-249.

SEMARNAP, 1997.

SEMARNAP, 1998.

SEMARNAP, INP, Carta Nacional Pesquera, 2000

Sikorski, Z.E. 1994. The myofibrillar proteins in seafoods. En *seafood proteins*. pp 40-57.

Sikorski, Z.E. y Pan, B.S. 1994. Introducción. En *Seafood proteins*. Editores: Sikorski, Z.E., Pan, B.S. y Shahidi, F. pp 1-5.

Sikorski, Z.E. y Pan, B.S. 1994. The involment of proteins and nonproteins nitrogen in postmortem changes in seafoods. En *Seafood proteins*. Editores: Sikorski, Z.E., Pan, B.S. y Shahidi, F. pp 71-75.

Smith, D. M. 1991. Factors influencing heat-induced gelation of muscle proteins. Cap. 17. En *interaction in food proteins*, N. Parris y R. Barford (Ed), ACS Symposium Series 454, Nueva York, EE. UU.

Sorimachi, H., Kimura, S., Kinbara, K., Kazacama, J., Takahashi, M., Yajima, H., Ishiura, S., Sasagawa, N., Nonaka, I., Sugita, H., Maruyama, K. y Suzuki, K. 1996. Structure and physiological functions of ubiquitous and tissue-specific calpain species. *Advan. Bioph.* 33:101-122.

Sorimachi, H., Saido, T. y Suzuki, K. 1994. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett.* 343:1-5.

SPSS, Professional Statistics 1997.

Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L. De Smet, S. y Demeyer, D. 1997. Early *post-mortem* conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscle beef. *Meat Sci.* 45:307-319.

Suda, A. 1973. Development of fisheries for non conventional species. *J. Fish. Res. Board. Canada*, 30:2121-2158.

Secretaría de Medio Ambiente. Recursos Naturales y Pesca. Sustentabilidad y Pesca responsable en México, Evaluación y manejo. Instituto Nacional de la Pesca, 1997-1998. 198-215.

Suzuki, A. Yamadera, Y., Kido, K. Y Watan, K. 1997. Sarcomere shortening and contraction nodes in stretched restrained ovine myofibres during post mortem storage. *Meat Sci.* 46:339-348.

Swatland, H.J. 1996. Connective tissue distribution pattern in beef detected by ultraviolet fibre optics. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 29:272-277.

Szczesniak, A. S. y Torgeson, K. W. 1965. Methods of meat texture measurement viewed from the background of factors affecting tenderness. *Adv. Food Res.* 14, 33.

Takano, E., Ma, H., Qiong, Y.H., Maki, M. y Hatanaka, M. 1995. Preference of calcium-dependent interactions between calmoduli-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett.* 362:93-97.

Taylor, R.G. Y Goll, D.E. 1995. Enzyme localization during *postmortem* muscle tenderization. *Ecceamst.* pp 347-358.

Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F. Koochmarai, M. y Goll, D.E. 1995a. Is Z-disc degradation responsible for *post-mortem* tenderization?. *J. Anim. Sci.*. 73:1351-1367.

Thomson, B.C., Dobbie, P.M. Singh, K. y Speck, P.A. 1996. *Post-mortem* kinetic of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Sci.* 44:151-157.

Toldrá, F. y Etherington, D. 1988. Examination of cathepsins B, D, H y L activities in dry-cured hams. *Meat Sci.* 23:1-6.

Ueng, Y. E., and Chow, Ch. J. 1998. Textural and histological changes of different squid mantle muscle during frozen storage. *J. Agric. Food Chem* 46, 4728-4733.

Valin, C. 1995. Animal and muscle variability in tenderisation: Possible causes. *Ecceamst.* 435-442.

Vargas, S. S. 1980. Inspección sanitaria del calamar (*Loligo spp*) con base sus cambios organolépticos post-cocción. Tesis licenciatura. Médico Veterinario Zootecnista. UNAM.

Wasson, D. H., Babbit, J. K. y French, J. S. 1992. Characterization of a heat stable protease from arrowtooth flounder; *atheresthes stomias*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1:167-182.

Weston, P.D., Barrett, A.J. y Dingle, J.T. 1969. Specific inhibition of cartilage breakdown. *Nature*. 222:285-286.

Wheeler, T.L. y Koohmaraie, M. 1994. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 72:1232-1238.

Whipple, G. y Koohmaraie, M. 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. *J. Anim. Sci.* 69:4449-4460.

Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. y Kiso, H. 1982. proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and mutocurrence and partial characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46:1983-1986.

Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. y Suzuki, K. 1995a. Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem Biophys. Resear. Communic.* 208:376-383.

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

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

ANEXO

Anexo I PREPARACIÓN DE HEMOGLOBINA Y CASEÍNA

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

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

Anexo II DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Para la determinación de proteína por el método de biuret (Gornall y col., 1949) se requiere la preparación de los siguientes reactivos:

- Pesar 1.5g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) más 6g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 500 ml de agua destilada.
- 300 mL de Hidróxido de sodio (NaOH) al 10 %.

Se afora 1000 mL con agua destilada, almacenándose en frasco ámbar.

Técnica:

- 1) Se mezclan 1 mL de la muestra problema mas 3 mL del reactivo de biuret
- 2) Se deja reposar durante 30 min
- 3) Las muestra se leen en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton. CA), a $\lambda = 540$ nm contra un blanco de reactivos.
- 4) Los datos obtenidos se correlacion con una curva patrón de Seroalbúmina-bovina de concentración de 0-10 mg/mL (Figura 40).

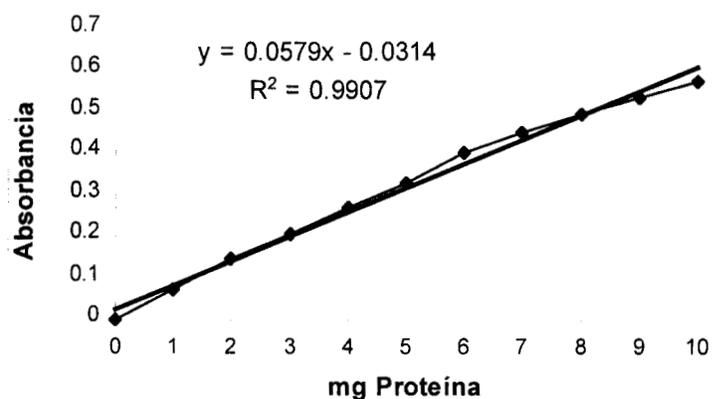


Figura 40. Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína.

Anexo III ELABORACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

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

- 1) Disolución de acrilamida /bis. Pesar 14.6g de acrilamida, 0,4g de N'N'-bis-metilen-acrilamida, disolver en 35 mL de agua y aforar a 50 mL.
- 2) Amortiguador Tris-HCL 1.5M, pH 8.8 (para gel de separación). Pesar 18.15g de base-Tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH con HCL 6N.
- 3) Amortiguador Tris-HCL 0.5M, pH 6.8 (para gel de concentración). Pesar 6.0g de base-tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCL 6N.
- 4) Amortiguador 5X, pH 8.3 (para corrida). Pesar 9.0g base-tris, 43.2g de glicina y 3g de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) y adicionar a 600 mL. Para una corrida electroforética diluir 60 mL de amortiguador 5X con 240 mL de agua desionizada, para una corrida electroforética.
- 5) Persulfato de amonio al 10%. Disolver 0.1g en 1 mL de agua. Este reactivo se prepara al momento de su utilización.
- 6) Colorante azul de bromofenol. Agregar 0.01g de azul de bromofenol en 172.5 mL de NaOH 0.1 M y aforar a 25 mL.
- 7) Colorante para corrida de muestras. Mezclar 3.8 mL de agua desionizada, 1.0 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 0.4 mL de 2-mercaptoetanol y 0.4 mL de azul de Coomassie y aforar a 100 mL en disolución desteñidora.
- 8) Disolución desteñidora. Se prepara con ácido acético, metanol y agua destilada en proporciones de 10:40:50, respectivamente.

Preparación de los geles

a) GEL DE SEPARACIÓN

Se prepara 10 mL de gel de separación utilizando una T=10% como se indica en la tabla siguiente:

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	4.02 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	2.5 mL
10% SDS	100 μ L
Acrilamida/bis	3.33 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 μ L

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

b) GEL DE CONCENTRACIÓN

Se prepara 5 mL de gel de concentración con una T=4%, utilizando las proporciones indicadas en la tabla siguiente:

REACTIVOS	CANTIDAD
Agua desionizada	3.05 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	1.25 mL
10% SDS	50 μ L
Acrilamida/bis	1.665 mL
Persulfato de amonio 10%	50 μ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 μ L

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

Preparación de las muestras

La preparación de la muestra para la corrida de los geles se realiza de la siguiente manera: se mezclan en una relación 1:4 muestra: amortiguador muestra. La muestra se hierve durante 5 min y se centrifuga por 5 min. a 13,000 r.p.m.

Finalmente se toman 20 μ L de cada una de las muestras para ser inyectadas en los geles.

Condiciones de electroforesis

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

Una vez colocados los geles e inyectado las muestras se deja correr durante 55 min. Tiempo aproximado para que el colorante azul de bromofenol alcanzara la parte final del gel. Una vez transcurrido el tiempo los geles se tiñeron con azul de Coomasie por 30-40 min., finalizando este tiempo se colocan en una disolución desteñidora, con recambios necesarios de esta disolución, de forma que se pudieran ver con claridad las proteínas en estudio.

Anexo IV EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Se utiliza una modificación del método reportado por Samejima y Wolfe (1976). A un peso conocido de carne se le adicionó 1:10 volúmenes de una disolución A previamente enfriada a 4°C. La mezcla de la carne y la disolución A se homogeniza por un minuto en una licuadora. El homogeneizado se centrifuga a 9000 r.p.m. a 4°C por 25 min. Se descarta el sobrenadante “a”. El precipitado “a” se resuspende nuevamente en una disolución A en una relación de 1:10, se centrifuga a 9000 r.p.m. a 4 °C por 25 min. Se descarta el sobrenadante “b”. El precipitado “b”, se resuspendió en una disolución B en una relación 1:6, se agitó a baja velocidad y se mantuvo a 4°C durante la noche. Posteriormente se centrifuga a 9000 r.p.m. a 4 °C por 25 min. Se descarta el precipitado “c”. Se decanta con cuidado el sobrenadante “c” y se diluye hasta una fuerza iónica de 0.1 con agua desionizada enfriada a 4°C, se deja reposar toda la noche en refrigeración. Se elimina por decantación el exceso de agua y se centrifuga a 9000 r.p.m. a 4 °C por 30 min. Se resuspende el precipitado “d” en 5 mL de la disolución C. Se dializa en una disolución C. Se centrifuga a 9000 r.p.m. a 4 °C por 15 min y se colecta el sobrenadante.

Disolución A	Disolución B	Disolución C
NaCl 0.1M	NaCl 0.6M	NaCl 0.6M
MgCl ₂ 2mM	MgCl ₂ 2mM	Amortiguador de fosfatos
EDTA 1mM	Amortiguador de fosfatos	pH6, 50mM
Dithiothreitol 0.5mM	pH6, 50mM	
Amortiguador de fosfatos		
pH7, 10mM		

Anexo V PESOS MOLECULARES CALCULADOS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS MEDIANTE FILTRACIÓN EN GEL (HPLC)

Tabla 17. Pesos moleculares de las fracciones del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Pesos moleculares (kDa) de fracciones 1-7 del extracto enzimático del músculo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)								
Bandas	Extracto	Frac 1	Frac 2	Frac 3	Frac 4	Frac 5	Frac 6	Frac 7
1	395.192							
2	364.946							364.946
3	265.409	265.409						265.409
4	203.542						203.542	203.542
5	158.181				158.181	158.181	158.181	158.181
6	146.068	146.068						146.068
7	110.548	110.548	110.548	110.548				110.548
8	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265
9	59.139							59.139
10	45.443							45.443
11	36.771							36.771
12	31.472							
13	29.116							29.116
14	27.147							
15	24.173							
16	19.282							
17	17.666							
18	16.109							
19	11.666							

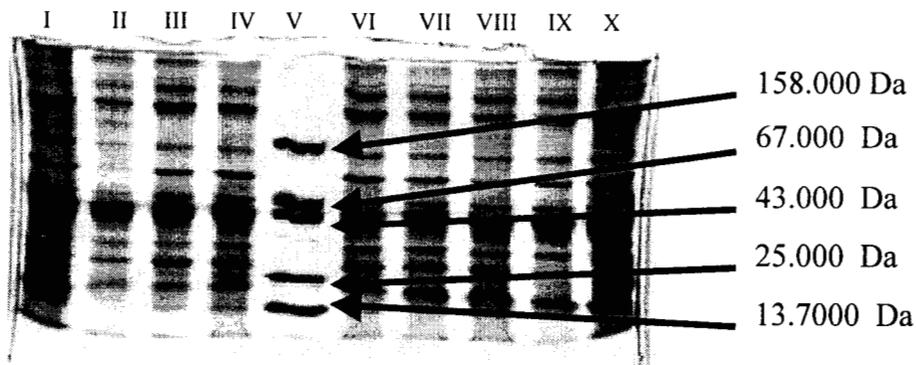


Figura 41. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%. I y X: Extracto enzimático. II a IV y VI a IX: Fracciones 8 a 10 y 11 a 14 respectivamente. V: Estándares de peso molecular conocido.

Tabla 18. Pesos moleculares de las fracciones del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Pesos moleculares (Da) de fracciones 8-14 del extracto enzimático del músculo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)								
Bandas	Extracto	Frac 8	Frac 9	Frac 10	Frac 11	Frac 12	Frac 13	Frac 14
1	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192
2	364.946				364.946	364.946	364.946	364.946
3	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409
4	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542
5	158.181	158.181				158.181	158.181	158.181
6	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068
7	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548
8	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265
9	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139
10	45.443		45.443	45.443	45.443	45.443	45.443	45.443
11	36.771		36.771	36.771	36.771	36.771	36.771	36.771
12	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472
13	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116
14	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147
15	24.173		24.173	24.173	24.173	24.173	24.173	24.173
16	19.282			19.282	19.282	19.282	19.282	19.282
17	17.666							
18	16.109							
19	11.666							

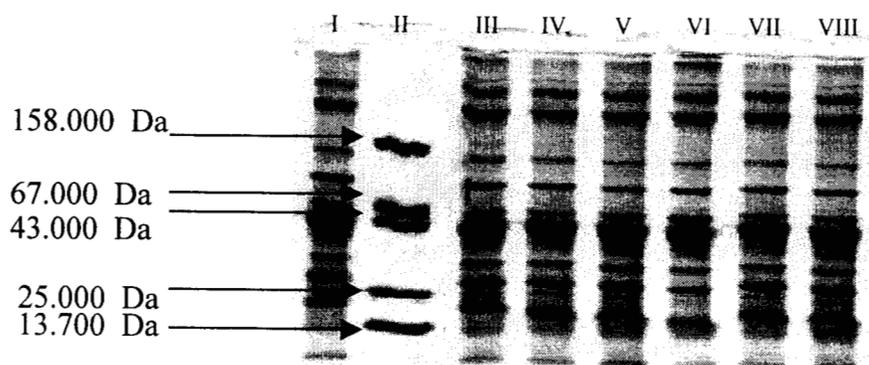
**Figura 42.** PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenidas mediante filtración en gel, T=10%. I y III a VIII: Fracciones 16 y 17 a 22 respectivamente. II: Estándares de peso molecular conocido.

Tabla 19. Pesos moleculares de las fracciones del extracto enzimático de músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Pesos moleculares (kDa) de fracciones 15-21 del extracto enzimático del músculo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)								
Bandas	Extracto	Frac 15	Frac 16	Frac 17	Frac 18	Frac 19	Frac 20	Frac 21
1	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192	395.192
2	364.946	364.946	364.946	364.946	364.946	364.946	364.946	364.946
3	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409	265.409
4	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542	203.542
5	158.181	158.181	158.181	158.181	158.181	158.181	158.181	158.181
6	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068	146.068
7	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548	110.548
8	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265	73.265
9	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139	59.139
10	45.443	45.443	45.443	45.443	45.443	45.443	45.443	45.443
11	36.771	36.771	36.771	36.771	36.771	36.771	36.771	36.771
12	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472	31.472
13	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116	29.116
14	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147	27.147
15	24.173	24.173	24.173	24.173	24.173	24.173	24.173	24.173
16	19.282	19.282	19.282	19.282	19.282	19.282	19.282	19.282
17	17.666							
18	16.109							
19	11.666							

**Anexo VI PESOS MOLECULARES CALCULADOS DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS MEDIANTE INTERCAMBIO CATIONICO (HPLC)**

Tabla 20. Perfil de pesos moleculares de las distintas fracciones obtenidas por intercambio catiónico (Fracciones 1-6)

Marcador Da	Frac 1	Frac 2	Frac 3	Frac 4	Frac 5	Frac 6
205.000	175.59	226.78	91.233	201.11	158.24	157.229
116.000	237.91	171.21	110.84	134.77	116.34	129.918
66.000	15.532	5.249	144.98	109.22	86.001	59.735
45.000	4.997		196.74	89.853	100.61	
29.000			226.50	58.164	71.609	
21.100			57.86		63.264	
14.200			6.574		22.684	
			16.215		57.081	

Tabla 21. Perfil de pesos moleculares de las distintas fracciones obtenidas por intercambio catiónico (Fracciones 7-12)

Marcador Da	Frac 7	Frac 8	Frac 9	Frac 10	Frac 11	Frac 12
205.000	103.5	169.55	115.96	127.54	115.13	114.952
116.000	90.69	90.993	108.83	109.81	107.4	107.207
66.000	63.52	62.486	59.631	72.504	24.067	59.005
45.000	34.53	32.259	29.807	64.807	28.397	24.157
29.000			22.25	29.783		
21.100				21.857		
14.200						

Anexo VII EFECTO DE INHIBIDORES DURANTE TRES DÍAS DE ALMACENAMIENTO

Tabla 22. Efecto de los diferentes inhibidores a los tres días de almacenamiento

Inhibidor	PH	Actividad proteolítica		
		Día cero	Actividad proteolítica a tres días	% de inhibición
PMSF	2.7	11.72	8.84	24.5
	3.1	36.68	24.76	32.49
	6.1	133.56	81.08	39.29
	7.3	146.96	100	31.95
	7.6	131.04	87.4	33.30
	2.7	17	10.72	36.94
	3.1	36.68	18.44	49.72
	6.1	73.72	37.08	49.70
	7.3	92.4	45.04	51.25
EDTA	7.6	85.08	41.48	51.24
	2.7	18.92	8.32	56.02
	3.1	35.96	17.36	51.72
	6.1	106.16	52.6	50.45
	7.3	117.56	57.8	50.83
Iodoacetamida	7.6	115.2	58.08	49.58
	2.7	11.76	5.08	56.80
	3.1	19.68	8.52	56.70
	6.1	75.4	38.88	48.43
	7.3	73.6	36.72	50.10
Pirofosfato	7.6	71.08	34.32	51.71

Tabla 22. Efecto de los diferentes inhibidores a los tres días de almacenamiento (continuación)

Inhibidor	pH	Actividad proteolítica		
		Día cero	Actividad proteolítica a tres días	% de inhibición
CaCl ₂	2.7	27.04	14.08	47.92
	3.1	58.6	32.96	43.75
	6.1	113.84	64.68	43.18
	7.3	119.88	65.36	45.47
	7.6	119.36	65.88	44.80
Pepstatin A	2.7	8.08	2.44	69.80
	3.1	11.88	3.04	74.41
	6.1	19.04	4.2	77.94
	7.3	20.76	4.76	77.07
	7.6	20.8	4.72	77.30
Leupeptin	2.7	19.2	3.04	84.16
	3.1	22.88	3.08	86.53
	6.1	45.76	6.64	85.48
	7.3	51.28	7.84	84.71
	7.6	50.8	7.68	84.88
I. Tripsina	2.7	21.44	3.56	83.39
	3.1	25.2	3.64	85.55
	6.1	61.36	8.48	86.17
	7.3	57.76	8.92	84.55
	7.6	53.48	8.44	84.21
Quimostatin	2.7	15.52	2.44	84.27
	3.1	19.16	2.92	84.75
	6.1	12.36	1.76	85.76
	7.3	40	5.92	85.2
	7.6	38.8	5.96	84.63

Anexo VIII MARCADORES DE PESOS MOLECULAR CONOCIDOS

Tabla 23. Marcadores utilizados

Proteína	Peso Molecular (Da)
Miosina	205.000
b-galactosidasa	116.00
Seroalbumina	66.000
Ovoalbúmina	45.000
Anhidrasa carbónica	29.000
Inhibidor de tripsina	20.100
Lactoalbúmina	14.200
Aprotinina	6.500

Anexo IX ANALIZADOR DE TEXTURA TA-XT2

Para la determinación del perfil de textura se utilizó el Analizador de Textura TA-XT2[®] (Texture Technologies Corp., Scarsdale, New York) equipado con el Texture Expert[®] software v. 1.20 (Stable Micro Systems, Ltd., Surrey, United Kindom)

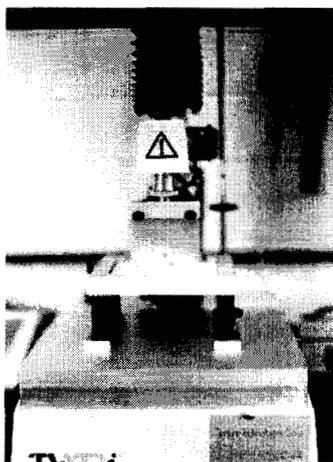


Figura 43. Tipo de instrumental de prueba utilizados en la evaluación de la textura. Navaja Warner-Bratzler para prueba de esfuerzo al corte

El parámetro resistencia al corte mediante la navaja de Warner-Bratzler, se midió mediante la siguiente figura:

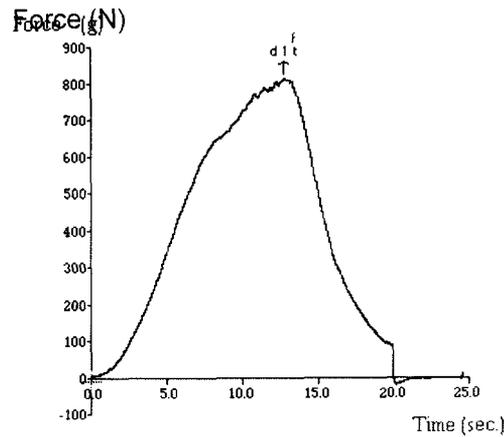


Figura 44. Esquema de la curva de Warner-Bratzler para una muestra del músculo de calamar.

Anexo X ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla 24

Análisis de varianza para la actividad en función del pH (pH's ácidos)

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
pH	21407.755	13	1646.750	116.192	.0001
Error	396.835	28	14.173		
Total	21804.591	41			

Análisis de varianza para la actividad en función del pH (pH's alcalinos)

	Suma de cuadrados	GL	Media de cuadrados	F	Sig.
pH	15530.122	8	1941.265	18.447	.0001
Error	1894.234	18	105.235		
Total	17424.355	26			

Análisis de varianza para la actividad en función de la temperatura

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Temperatura (°C)	173340.997	11	15758.272	8.848	.0001
Error	299220.083	168	1781.072		
Total	472561.080	179			

Análisis de varianza para el efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Inhibidores	110845.968	9	12316.219	13.323	.0001
Error	73956.741	80	924.459		
Total	184802.709	89			

Análisis de varianza para el esfuerzo al corte del manto del calmar gigante (*Dosidicus gigas*) crudo

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Esfuerzo al corte (N)	301.448	4	75.362	102.533	.0001
Error	14.700	20	.735		
Total	316.148	24			

Análisis de varianza para el esfuerzo al corte del manto del calmar gigante (*Dosidicus gigas*) cocido

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Esfuerzo al corte (N)	229.314	4	57.328	140.657	.0001
Error	8.152	20	.408		
Total	237.465	24			

Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la cromaticidad.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	1.951	3	.650	604.969	.0001
Error	8.600E-03	8	1.075E-03		
Total	1.960	11			

Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la luminosidad.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	5.345	3	1.782	30.116	.0001
Error	.473	8	5.916E-02		
Total	5.818	11			

Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la tonalidad.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	3.350E-02	3	1.117E-02	134.000	.0001
Error	6.667E-04	8	8.333E-05		
Total	3.417E-02	11			