



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos  
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

**Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos**

**Efecto del pH y concentración de NaCl sobre las propiedades gelificantes de  
un concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**Q.A. Guadalupe Dihort García**

**Hermosillo, Sonora**

**Febrero de 2013**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## HOJA DE APROBACIÓN

**Efecto del pH y concentración de NaCl sobre las propiedades gelificantes de un concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)**

**Guadalupe Dihort García**

---

Dr. Enrique Márquez Ríos  
Director de la tesis

---

Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer  
Sinodal

---

Dr. José Alberto Ramírez de León  
Sinodal

---

Dra. Ofelia Rouzaud Sáñez  
Sinodal

## **DERECHOS DE AUTOR**

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador de Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

---

**M.C. Guadalupe Dihort García**  
**Autor**

---

**Dra. Maribel Robles Sánchez**  
**Coordinador del Programa de Posgrado**

Hermosillo, Sonora.

Febrero de 2013.

## DEDICATORIA

A mis dos grandes amores...

Christian...

Quien llego a mi vida hace más de ocho años y me ha demostrado que a pesar del tiempo y todas las contrariedades lo más importante es el amor...

Gracias por alimentar esta relación y apoyarme en todo lo posible para concluir esta etapa de mi vida... Un logro que también es tuyo...

Gael...

Quien llene de amor y cuidado durante nueve meses en mi vientre... y hoy a pesar de ser tan pequeño, eres una gran estímulo para dar lo mejor que tengo cada día...

Estoy infinitamente agradecida en que Dios, haya confiado en nosotros para protegerte y educarte...

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por ser tan generoso y concederme, primeramente el Privilegio de ser Madre, encontrar al ser ideal para recorrer éste camino y después de todo, un logro Profesional más...

A CONACyT, esperando que éste logro personal sea el granito de arena aportado, para que nuestro posgrado pueda continuar apoyándonos otorgando becas...

A la Universidad de Sonora, por toda la infraestructura aportada para el desarrollo de ésta tesis...

A cada miembro del Comité de Tesis, que con sus aportaciones y detalles simplificaron por mucho la estructura de éste trabajo...

Al personal administrativo de la Oficina, por apoyar y asesorar en cada paso durante dos años y fracción...

A mi Esposo, por tu paciencia y nobleza, agradezco todo lo que tu persona eres, ya que sin ti esta familia no sería...

A mis padres, quienes me dieron un hogar, educación y amor... les agradezco infinitamente el haber hecho de mí una persona de bien con su ejemplo y rectitud...

A mis hermanos, que los quiero con todo mi corazón, que de alguna forma, son parte de mi profesión...

A mis cuñadas y suegra, por ser el sustituto ideal para mi hijo en mis tiempos de ausencia...

A mis amigos: Iván Tolano, Gloria Mayboca, Ana Leticia García, Faviola Reyes, Fernanda Saad, Génesis Buitimea, Ivonne Bernal, Nadia López, Nathaly Montoya y Dalila Canizales. Quienes espero a corto plazo coincidir nuevamente en algún lugar y continuar con ello la amistad formada en esta etapa...

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
HOJA DE APROBACIÓN .....	ii
DERECHOS DE AUTOR .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
CONTENIDO .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Generalidades del Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	4
Importancia de la Pesquería .....	4
Composición Química del Calamar.....	7
Concentrados Proteicos .....	9
Gelificación de Concentrados Proteicos .....	10
Factores que Afectan la Gelificación .....	11
Efecto de la Fuerza Iónica .....	11
Efecto del pH .....	12
Efecto de la Temperatura.....	13
Caracterización de los Cambios Estructurales y Conformacionales de Sistemas Proteicos .....	14
Caracterización Macroestructural .....	15
Viscoelasticidad .....	15
Textura .....	16
Capacidad de retención de agua (CRA) .....	17
Caracterización Microestructural.....	18
Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	18

Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	19
Calorimetría de barrido diferencial (CBD) .....	19
Caracterización Molecular .....	21
Dicroísmo circular (DC) .....	21
Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF)	22
Contenido de sulfhidrilo total (SHT) .....	23
Determinación de la hidrofobicidad de superficie .....	24
Perfil electroforético (SDS-PAGE) .....	26
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	28
Objetivos Específicos .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Materia Prima .....	29
Elaboración del Concentrado Proteico (CP) .....	29
Elaboración de Soles y Geles .....	31
Caracterización de los Cambios Estructurales y Conformacionales de Soles y Geles.....	31
Caracterización Macroestructural .....	31
Viscoelasticidad .....	31
Análisis de perfil de textura (APT) .....	32
Prueba de doblado (PD) .....	32
Capacidad de retención de agua (CRA) .....	33
Caracterización Microestructural .....	33
Calorimetría de barrido diferencial (CBD) .....	33
Caracterización Molecular .....	34
Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (IR-TF)	34
Contenido de sulfhidrilo total (SHT).....	34
Hidrofobicidad de superficie.....	35
Perfil electroforético (SDS-PAGE) .....	36
Diseño Experimental .....	37
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	38
Rendimiento .....	38
Caracterización Macroestructural .....	40

Efecto sobre la Viscoelasticidad.....	40
Efecto sobre la Textura.....	44
Efecto sobre la Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	48
Caracterización Microestructural .....	51
Efecto sobre las Transiciones de Fase .....	51
Caracterización Molecular .....	55
Efecto sobre la Estructura Secundaria .....	55
Efecto sobre el Contenido de Sulfhidrilo Total (SHT).....	62
Efecto sobre la Hidrofobicidad de Superficie .....	64
Efecto sobre el Peso Molecular.....	67
CONCLUSIONES .....	73
RECOMENDACIONES .....	74
REFERENCIAS .....	75

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA</b>		<b>Página</b>
1	Comparativo del rendimiento de la obtención con un ciclo de lavado del concentrado proteico de calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) con el de otros tratamientos .....	39
2	Prueba de Doblado de los geles de CP de calamar gigante.....	45
3	Temperatura máxima ( $T_m$ ) y entalpía ( $\Delta H$ ) de termograma de CDB de soles de CP a sus respectivos tratamientos .....	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>Página</b>
1	Morfología del calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	5
2	Producción pesquera mundial, nacional y estatal de calamar gigante en peso vivo (t), así como el valor de producción pesquera nacional de calamar (pesos) .....	6
3	Diagrama para la elaboración del concentrado proteico para la obtención de geles y caracterización de sus cambios estructurales y conformacionales .....	30
4	Modulo de almacenamiento desarrollado durante el calentamiento de las proteínas de soles de CP de calamar gigante a sus respectivos tratamientos.....	41
5	Análisis de perfil de textura de geles de CP a sus respectivos tratamientos.....	47
6	Capacidad de retención de agua de los geles obtenidos de CP de calamar gigante a sus respectivos tratamientos .....	49
7	Espectro de IR de soles de concentrados proteicos de Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) a sus respectivos tratamientos.....	57
8	Espectro de IR de geles de concentrados proteicos de Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) a sus respectivos tratamientos.....	58
9	Contenido de SHT en soles y geles de concentrados proteicos de calamar gigante a diferentes % NaCl (1, 2, 3) y pH (6.0, 6.5, 7.0).....	63
10	Efecto de la concentración de NaCl (1, 2 y 3%) y pH (6.0, 6.5 y 7.0) sobre la hidrofobicidad de superficie de soles de CP de Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	65
11	Efecto de la concentración de NaCl (1, 2 y 3%) y pH (6.0, 6.5 y 7.0) sobre la hidrofobicidad de superficie de geles de CP de Calamar Gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	66

12	Perfil electroforético (SDS-PAGE) de proteínas del MC (a), así como soles (b) y geles (c) de CP a sus respectivos tratamientos .....	69
13	Perfil electroforético (SDS-PAGE reductor) de proteínas del MC (a), así como soles (b) y geles (c) de CP a sus respectivos tratamientos .....	70

## RESUMEN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un recurso pesquero sub-utilizado, a pesar de ser una especie abundante en el Golfo de California. Debido a sus características, su músculo tiene potencial para ser utilizado en la manufactura de concentrados proteicos (CP), los cuales pueden ser usados como base para la elaboración de surimi, o bien, como ingrediente alimenticio debido a su capacidad de formar de geles. No obstante, el principal inconveniente de las proteínas del calamar gigante, es su baja capacidad gelificante, en relación a otras especies de pescado. En consecuencia, en el presente estudio se evaluó el efecto del pH y concentración de NaCl sobre la propiedad gelificante de un concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenido mediante la modificación del método tradicional. Se obtuvo una mejora en la propiedad gelificante del CP a pH 6.0 y 1% de NaCl, conforme el análisis del perfil de textura (APT). Durante la transición sol-gel se apreció una disminución en la hidrofobicidad de superficie, ésta correspondió al incremento en la intensidad de la banda relacionada con la estructura hélice- $\alpha$ . Por otra parte, el contenido de sulfhidrilos totales (SHT) desciende en la formación del gel. Mediante la viscoelasticidad y la CRA, es posible observar la formación de un gel más estructurado y con mayor dureza a pH 7.0. De acuerdo a la calorimetría de barrido diferencial (CBD) se detectó que ambas variables de estudio ocasionaron cambios en la estructura y conformación de las proteínas, encontrando la mayor entalpia y temperatura de desnaturalización a pH 7.0 y 1 % de NaCl. Nuestros resultados demuestran que, variando el pH y la concentración de NaCl es posible obtener una mejora en la propiedad gelificante de CP de calamar.

## INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es un recurso abundante en el noroeste de México. Las características de su músculo y su bajo precio en el mercado hacen de él una especie atractiva para la elaboración de concentrados proteicos. Permitiendo así darle un uso más eficiente a recursos pesqueros de bajo costo o sub-utilizados (Marmon y col., 2010). Los concentrados proteicos pueden utilizarse como base para la elaboración de análogos de productos de pescado u otros productos basados en la capacidad de formación de gel, como por ejemplo: imitación camarón, langosta, jaiba, etc. (Felix-Armenta y col., 2009). La forma más común para su obtención consiste en una serie de lavados del músculo con agua o solución de baja fuerza iónica, considerándose a la proteína insoluble como concentrado proteico. Esta tecnología demanda una gran cantidad de agua debido a que el proceso incluye 2-3 ciclos de lavado en razones que van de 1:5 a 1:9 (músculo: agua: agua), esto con la finalidad de realizar una completa remoción de proteína sarcoplásmica, pigmentos y lípidos. No obstante, en el caso del manto de calamar no es necesaria la aplicación de varios ciclos, ya que las proteínas miofibrilares de esta especie son altamente solubles en soluciones de baja fuerza iónica (Sánchez-Alonso y col., 2007), en consecuencia la remoción de proteína sarcoplásmica es más eficiente. Asimismo, la especie no posee pigmentos como el caso de los peces, además, la especie es magra.

Gómez-Guillén y Montero (1997) obtuvieron concentrados proteicos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) mediante el método tradicional, reportando una baja calidad funcional de las proteínas extraídas, como resultado de ello se procedió estudiar la adición de proteína vegetal o animal, así como la de otros polímeros naturales a base de carbohidratos con la finalidad

mejorar las propiedades gelificantes (Gómez-Guillén y col., 1998). Por otra parte, Cortés-Ruiz y col.(2008), así como Dihort-García y col. (2011) empleando calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtuvieron concentrados proteicos mediante solubilización ácida y alcalina respectivamente, para después estudiar las propiedades funcionales de los concentrados proteicos obtenidos. Cortés-Ruiz y col.(2008) y Dihort-García y col. (2011), reportaron una mejora en la capacidad gelificante de las proteínas extraídas, así como cambios estructurales de las proteínas de los concentrados proteicos. Sin embargo, su propiedad gelificante fue inferior a la reportada para varias especies de pescado.

Actualmente, el 89% de la producción pesquera de calamar gigante se destina principalmente a exportación en tanto que el 11% se comercializa en el mercado nacional como productos no terminados (Salinas y col., 2003). Por consiguiente, existe la necesidad de estudiar opciones u alternativas encaminadas generar un producto de valor agregado como son los concentrados proteicos. El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una especie con características sobresalientes para hacer concentrados proteicos y surimi, debido a su abundancia, rendimiento, color y su bajo contenido lipídico. Sin embargo, sus proteínas no producen buenos geles, en comparación con otras fuentes.

Por consiguiente existe la necesidad de estudiar otras opciones u alternativas encaminadas a mejorar las propiedades gelificantes de concentrados proteicos a base de calamar. Por otra parte la comprensión de los cambios que ocurren en la estructura de las proteínas durante el proceso de elaboración de soles y geles proteicos podría redundar en la optimización de la funcionalidad de las proteínas. Se ha estudiado el método tradicional, así como las disoluciones ácidas/alcalinas; sin embargo, no existen investigaciones encaminadas a evaluar el efecto del pH y concentración salina en forma conjunta sobre la gelificación de proteínas

extraídas. Por ello, en el presente estudio se evaluó el efecto de estas dos variables sobre las propiedades gelificantes, así como los cambios conformacionales que ocasionan a las proteínas, con la finalidad de explicar las características texturales de los geles obtenidos.

## **ANTECEDENTES**

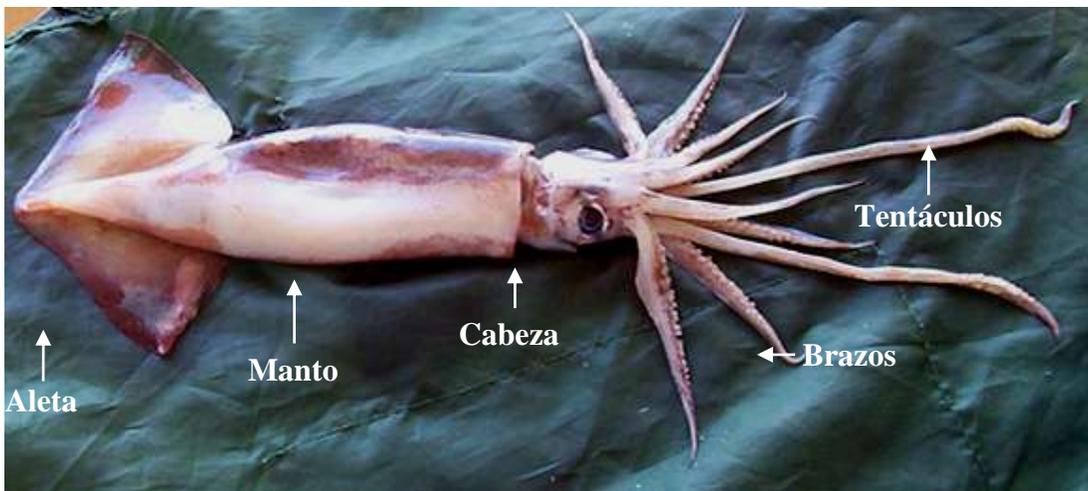
### **Generalidades del Calamar Gigante (*Dosificas gigas*)**

El calamar es un molusco cefalópodo con simetría bilateral, no segmentado, de cuerpo blando y desnudo, sus principales porciones anatómicas se constituyen de un manto, vísceras, cabeza, tentáculos y una pluma quitinosa (Lluch y col., 2001). Su cuerpo tiene forma cilíndrica, comprimida y está formado por dos regiones: la "cabeza" que es la más cercana a los brazos, lleva los ojos y la boca; y el "manto" que se extiende por encima de ella, dentro del cual se encuentran los aparatos y sistemas (Figura 1) (Cifuentes y col., 1997). Siendo el manto (músculo) el constituyente principal de las porciones anatómicas del calamar según Martínez y col., (2000).

El calamar gigante domina el océano abierto de aguas tropicales y zonas templadas, según Nignatullin y col. (2001) pueden ser distinguidos tres grupos intraespecíficos en base al tamaño, siendo estos: pequeños (longitud de manto (LM) de adultos machos 130-260 mm y hembras de 140-340 mm), medianos (240-420 y 280-600 mm, respectivamente) y grandes (>400-500 mm y 550-650 hasta 1000 mm o más, respectivamente). Su crecimiento es rápido, por lo que su periodo de vida es cerca de un año, aunque se han registrado especímenes de probablemente 2 años.

### **Importancia de la Pesquería**

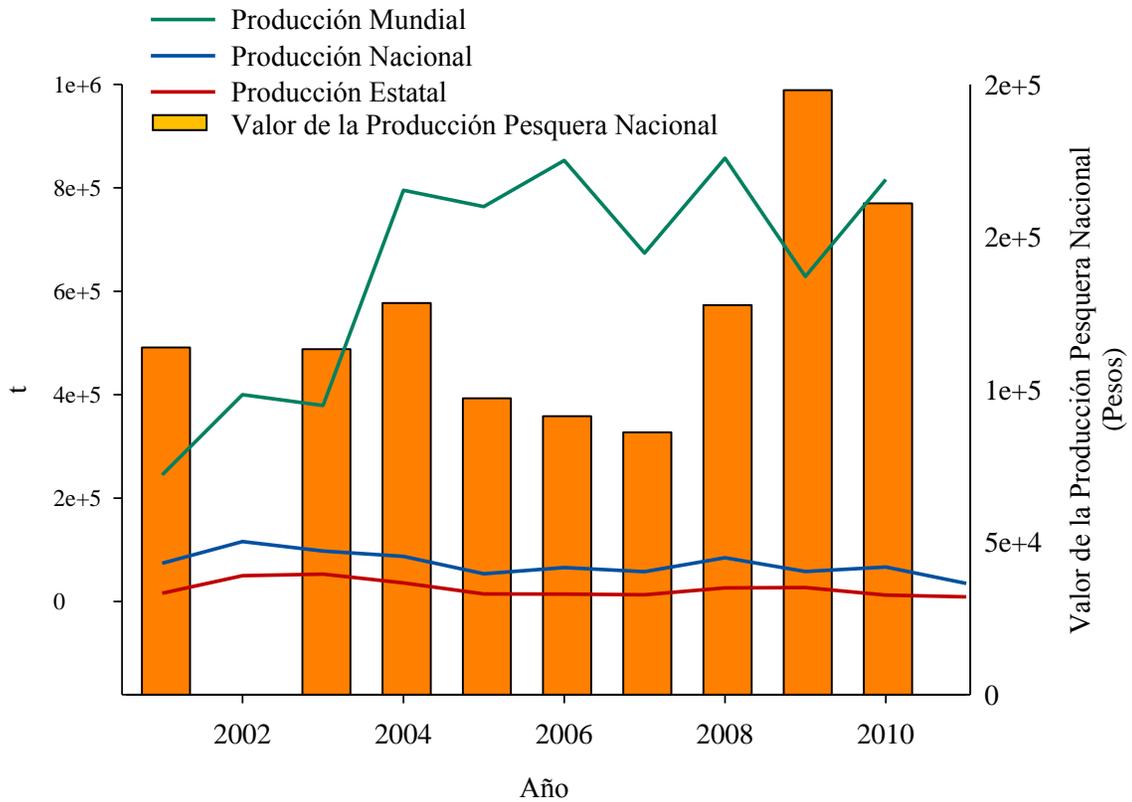
Los calamares de la familia *Ommastrephidae*, a la cual pertenece el calamar gigante, contribuyen al mayor porcentaje de las capturas totales de las pesquerías de cefalópodos a nivel mundial (Markaida, 2001). En el 2010 se registraron 815978 t (Figura 2), lo cual



**Figura 1.** Morfología del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Fuente: Cortesía de John Snow.

Recuperada en: <http://www.mexfish.com/fish/hbsquid/hbsquid.htm> (septiembre, 2012)



**Figura 2.** Producción pesquera mundial, nacional y estatal de calamar gigante en peso vivo (t), así como el valor de producción pesquera nacional de calamar (pesos).

Fuente: Anuario Estadístico de Pesca (2011); FAO-Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (2010).

represento el 0.92% de la producción pesquera mundial, posicionándolo dentro de las principales 20 especies capturadas a nivel mundial (FAO, 2010).

La pesquería de calamar gigante ha sido una de las actividades más relevantes en el sector pesquero de México durante los últimos años, encontrándose posicionado en el quinto lugar dado su volumen de producción pesquera. Mientras que, considerando su valor económicos localiza en el décimo octavo lugar. En el año 2011 su producción en peso vivo represento alrededor del 1.97% (32848 t) de la captura total nacional (1660474 t), siendo Sonora la segunda potencia en este rubro con un volumen de 9811 t, representando el 29.86 % de la captura de calamar (Figura 2).

El calamar gigante es la segunda especie más importante en términos de volumen de captura para el sector pesquero en Guaymas, Sonora. Su captura genera empleos directos e indirectos durante seis a ocho meses al año en el sector pesquero; además, representa una actividad económica alternativa y complementaria para los pescadores de la región (De la Cruz-González y col., 2007).

### **Composición Química del Calamar**

Excluyendo el contenido de agua (75-84%), las proteínas son el principal componente del músculo de calamar (13-22%), conteniendo además lípidos (0.1-2,7%) y minerales (0.9-1.9%) en menor proporción (Lluch y col., 2001). Basándose en sus características de solubilidad las podemos clasificar en: miofibrilares (solubles en soluciones salina,  $I=0.5$ ), estromales (insolubles en soluciones salina,  $I=0.5$ ) y sarcoplásmicas (solubles en agua) (Hashimoto y col., 1979). Las miofibrilares son las más abundantes, ya que constituyen el 55-60% del total de proteínas del músculo y forman su estructura fibrosa (Kijowski, 2001).

Las proteínas miofibrilares del calamar difieren de las proteínas del pescado y mamíferos al ser más solubles en agua, menos susceptibles a la congelación y más propensas a la desnaturalización térmica (Ramírez-Olivas y col., 2004). Tienen características térmicas diferentes, debido a la presencia de la paramiosina. Se ha reportado que ésta altera considerablemente las características de textura en los productos gelificados a partir de proteína muscular de especies marinas. Por lo que, tanto el contenido de paramiosina como las diferentes interacciones miosina-paramiosina podrían relacionarse, al menos parcialmente con el comportamiento térmico observado en las proteínas miofibrilares de invertebrados marinos, debido a los cambios en el medio ambiente químico (Paredi y col., 2002).

Las proteínas estromales constituyen el 10-20 % de las proteínas del tejido muscular, son insolubles en agua o en soluciones salinas y se constituyen fundamentalmente por proteínas del tejido conectivo tales como: colágeno, reticulina y elastina (Beltrán, 2000). De éstas, el colágeno es el principal constituyente del tejido conectivo y juega un papel muy importante, ya que es el encargado de la unión entre varias células. El colágeno, específicamente el del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), participa en los mecanismos natatorios del organismo; asimismo, su contenido es diferente para cada región anatómica (manto, aletas, tentáculos). Siendo así, que los tentáculos presentan el mayor contenido de colágeno insoluble (Torres-Arreola y col., 2008).

Las proteínas sarcoplásmicas se localizan dentro del sarcolema, son solubles en agua o en soluciones salinas de baja molaridad (<50 mM) y comprenden cerca del 30 a 35% de las proteínas totales del músculo (Xiong, 1997). La mioglobina es presuntamente la más importante, debido a que es la responsable del color de la carne, que es relacionado con la

calidad del producto (Kijowski, 2001). Sin embargo, en cefalópodos como el calamar, la hemocianina es la proteína que realiza la función que la mioglobina hace en organismos vertebrados, es decir, transporta el oxígeno a través del cuerpo. A diferencia de la mioglobina, la hemocianina presenta un color azul cuando se encuentra oxigenada mientras que cuando esta desoxigenada es incolora.

### **Concentrados Proteicos**

Algunos concentrados proteicos son diseñados solamente para ser utilizados con propósitos nutricionales, debido a su excepcional valor nutricional, pero limitadas propiedades funcionales. Otros tienen propiedades funcionales deseables para la industria alimentaria y pueden ser utilizados en los alimentos por estos atributos. La medición y definición de la funcionalidad proteica comienza al nivel de la estructura de la proteína, por tanto aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los alimentos en su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo y pueden contribuir a la calidad y atributos sensoriales del producto final definen las propiedades funcionales de las proteínas (Kinsella, 1976).

Aunque se han desarrollado varios procesos para la elaboración de concentrados proteicos, la mayoría se basan en la solubilización del músculo de pescado triturado en agua; para eliminar lípidos y proteínas sarcoplásmicas, concentrándolas proteínas miofibrilares (Stillings y Knobl, 1971).

## **Gelificación de Concentrados Proteicos**

El principal uso de los concentrados proteicos y surimis es la elaboración de productos gelificados. La capacidad de las proteínas de formar geles se encuentra afectada por su solubilidad, que ésta a su vez se encuentra fundamentalmente relacionada con el equilibrio entre la hidrofobicidad e hidrofilia en la estructura proteica. Normalmente cuando las proteínas de la pasta son solubilizadas mediante la adición de sal (en razón de 1-3 %), la adición de sal rompe enlaces iónicos dentro de las proteínas, las disuelve y desestabiliza su estructura molecular para la subsecuente desnaturalización térmica y promueve interacciones hidrofóbicas. Estas interacciones hidrofóbicas, el re arreglo de los enlaces de hidrógeno, así como los enlaces covalentes de las proteínas juegan un importante papel en la formación de la red proteica cuando el sol es calentado (Sánchez-González y col., 2008).

La gelificación proteica consiste en la transformación de una proteína en estado de sol a estado de gel. El sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas (de 1-1000 nm en tamaño) en un medio líquido, presenta plasticidad y viscosidad (Sahin y Gülüm, 2006). El gel se obtiene como resultado del calentamiento del sol, a través del entrecruzamiento de proteínas mediante enlaces covalentes o no covalentes, para formar una red que inmoviliza el agua y otras sustancias de bajo peso molecular, impidiendo su flujo al aplicar una fuerza externa (presión o centrifugado) (Kijowski, 2001; Flores y Bermell, 1986). Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente fuerzas atractivas (hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno y/o puentes disulfuro) y repulsivas (electrostáticas y las interacciones agua-proteína) entre cadenas polipeptídicas (Fenemma, 2000). El pH, así como el tipo y concentración de sal utilizada, afectan el grado de interacción entre las proteínas, ya

que modifican su estructura terciaria y distribución de cargas, alterando con ello la naturaleza y estructura del gel (Flores y Bermell, 1986).

## **Factores que Afectan la Gelificación**

### **Efecto de la Fuerza Iónica**

Durante la elaboración de concentrados proteicos, la función primaria de la sal es solubilizar a las proteínas miofibrilares y subsecuentemente inducir su unión para formar el gel. La sal incrementa la disociación de la actomiosina promovida a través de cortes físicos durante la homogeneización. La miosina disociada participa entonces, en la formación de la matriz del gel uniéndose al agua y a otras proteínas (Kim y Park, 2008). Cuando se adiciona la sal, el balance neto de las cargas positivas o negativas en la proteína puede cambiar dependiendo de su concentración. El desplegamiento de las proteínas causa la exposición de grupos hidrofóbicos; el exceso de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  (150- y 400-mM NaCl) puede ocasionar interacciones negativas entre las moléculas de proteínas lo cual favorece las interacciones hidrofóbicas y por consiguiente se reduce la solubilidad de las proteínas. En este sentido, Thawornchinsombut y Park (2007), encontraron que la adición de NaCl a una concentración de 400mM puede resultar en un gel duro debido a la desnaturalización química inducida por interacciones iónicas e hidrofóbicas así como la formación de enlaces disulfuro.

En otro estudio, Kim y Park (2008) observaron una mejora en la cohesividad de los geles de surimi convencional cuando se adiciono sal del 1 a 3%, no obstante la fuerza de estos geles no fue afectada por la adición de sal; en cambio en la extracción ácida y alcalina del concentrado proteico los valores de fuerza de ruptura y cohesividad incrementaron conforme se aumentó el contenido de sal. Por lo tanto, Kim y Park (2008), encontraron que la adición de NaCl mejora

las propiedades gelificantes, lo cual puede ser debido a que el NaCl tiene gran contribución en la solubilidad de las proteínas miofibrilares.

La fuerza iónica altera la carga de las proteínas miofibrilares, ya que se unen a ellas iones cargados negativamente y positivamente, llevando a un cambio en el pI. Además se ha demostrado que el pH y la fuerza iónica afectan la microestructura del gel (Bertram y col., 2004). Estudios realizados por Thawornchinsombut y Park (2004), demuestran que el pH y la fuerza iónica juegan un papel importantes en la proteínas musculares de la merluza del pacífico (*Merluccius productus*), éstos investigadores encontraron una mejora sustancial de la solubilidad al obtener un concentrado por medio del método convencional de surimi. Sin embargo, aunque la solubilización de las proteínas miofibrilares en soluciones salinas se relacione con las propiedades funcionales del músculo de pescado (habilidad gelificante, emulsificante y capacidad de retener agua), la solubilidad no es un indicador suficiente de la habilidad de formar geles de los concentrados proteicos tratados a bajos o altos pH (Kim, 2002).

### **Efecto del pH**

La carga neta de las proteínas está en función del pH del medio. Éstas tienen carga neta negativa a pH por encima de su pI y carga neta positiva a pH por debajo de su pI. El pH del medio o el pH al cual se elabora un gel proteico afecta las características o calidad del gel obtenido. En la industria alimentaria, los productos gelificados normalmente se elaboran a pH's en el rango de 6-7, ya que es el pH en cual normalmente oscila el músculo de los organismos terrestres. En este sentido, De la Fuente-Betancourt y col. (2009), evaluaron el efecto del pH y fuerza iónica del homogeneizado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en su

composición, encontrando que se afecta principalmente a la miosina, paramiosina y actina después de la incubación a pH 13, asimismo, la solubilidad en la escala de pH. De tal forma que De la Fuente-Betancourt y col. (2009), encontraron que un incremento en la fuerza iónica reduce el pI y la menor solubilidad de las proteínas de calamar ocurre a pH de 5 a  $I= 0.05$ .

En otro estudio, Liu y col. (2010), estudiaron la relación entre las propiedades del gel y la estructura secundaria de la miosina de carpa plateada (*H. molitrix*) a pH de 5.5-9.0, encontrando que al incrementar el pH, la velocidad de gelificación y la dureza del gel decrecen, mientras que la capacidad de retención de agua (CRA) incrementa, también una alta fracción de hoja- $\beta$  y giro- $\beta$  antes del calentamiento pueden mejorar el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), a 90 °C, aunque reduciría la CRA.

### **Efecto de la Temperatura**

El calentamiento es la forma más común para la elaboración de geles proteicos. Cuando se calienta gradualmente una proteína en disolución, por encima de una temperatura crítica, sufre una desnaturalización abrupta de un estado nativo al desnaturalizado. El mecanismo por el cual se induce dicha desnaturalización es complejo e implica fundamentalmente la desestabilización de interacciones no covalentes (Damodaran, 2000).

Durante el calentamiento, la proteína en estado de sol se transforma primero en un “estado progel”, por desnaturalización. El progel suele ser un líquido viscoso en el que ya ha tenido lugar un cierto grado de polimerización. En esta etapa la proteína se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno), de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir, la constitución de la red tridimensional de la proteína. Cuando el progel se enfría a temperatura

ambiente o temperatura de refrigeración, el descenso de la energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales expuestos a las diversas moléculas; esto es lo que constituye la gelificación (Fenemma, 2000). Los cambios que sufren los sistemas proteicos durante el calentamiento pueden apreciarse claramente mediante medidas dinámicas oscilatorias o a través de la calorimetría diferencial de barrido (Ako y col., 2010).

## **Caracterización de los Cambios Estructurales y Conformacionales de Sistemas Proteicos**

El entendimiento de los cambios estructurales en las proteínas ocurridos durante el proceso de elaboración de concentrados proteicos hasta la transición sol-gel, puede brindar información valiosa para inferir sobre las posibles variaciones de la funcionalidad proteica. Dichos cambios pueden ser caracterizados desde el punto de vista molecular, microestructural o macroestructural; sin embargo, se requiere aplicar más de una metodología para caracterizarlos apropiadamente y su entendimiento es complicado.

La caracterización molecular del sistema requiere evaluación de las propiedades relacionadas a las transformaciones moleculares que ocurren durante la formación del gel. La evaluación microestructural implica el seguimiento de reacciones y cambios físicos que no pueden ser observados a simple vista. Mientras que, la evaluación macroestructural involucra la evaluación de propiedades físicas y químicas del sistema como un todo (Pilosof, 2000). A continuación se mencionan varias técnicas para la caracterización de los cambios conformacionales con el objeto de brindar una visión general, debido a los objetivos que

persigue la presente investigación se enfatizara sólo en algunas secciones, las cuales se encuentran dentro de la metodología experimental.

## **Caracterización Macroestructural**

### Viscoelasticidad

En la formación de un gel, las proteínas se someten a una transición de fase, de líquido a gel, ocurriendo una agregación ordenada de proteínas con importantes cambios conformacionales, este fenómeno es conocido como gelificación (Winter y Chambon, 1986; Pilosof, 2000). Los geles al ser un material viscoelástico son caracterizados esencialmente mediante dos ensayos: métodos transientes (ensayos de “creep” y relajación de la tensión) y métodos dinámicos (oscilatorios) (Pilosof, 2000). Se ha reportado el empleo de las propiedades reológicas dinámicas para el estudio de cambios estructurales (Park y Park, 2007; Riebroy y col., 2009; Tadpitchayangkoon y col., 2010). Para la determinación de las propiedades dinámicas oscilatorias es común el empleo de reómetros oscilatorios de amplitud de deformación pequeña para determinar los límites del comportamiento viscoelástico lineal, así como el barrido de frecuencias que muestran la manera en que el comportamiento elástico y viscoso del material cambia con la velocidad de aplicación de la deformación (Pilosof, 2000).

Tadpitchayangkoon y col. (2010) estudiaron el efecto de los tratamientos de pH de las proteínas sarcoplásmicas de pez gato rallado (*Pangasius hypophthalmus*) con el objetivo de comprender el papel de éstas proteínas en la gelificación de concentrados proteicos. Observaron que los módulos de almacenamiento y fase varían con los tratamientos de pH, de tal forma que las proteínas sarcoplásmicas se agregan en mayor grado después de ser sometidas a una extracción a pH extremos (3.0 y 11.0), seguido de la precipitación

isoelectrica. En otro estudio, realizado por Liu y col. (2010), en donde se estudiaron las propiedades reológicas de la miosina de carpa plateada (*H. molitrix*), encontrando que las muestras a pH's de 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 comienzan a formar el gel a 31.2, 34.4, 23.2, 27.5 y 29.6 °C, respectivamente, conforme lo indica el incremento de  $G'$  y  $G''$  y el descenso de  $\delta$ , continuando la gelificación hasta los 40 °C, para posteriormente llegar a un debilitamiento del gel.

### Textura

Los concentrados proteicos pueden tener infinidad de usos en la industria alimentaria, sin embargo, uno de sus usos potenciales es la elaboración de surimi, en donde la propiedad gelificante es sin duda el parámetro más importante, la cual puede medirse a través de parámetros que definan la textura. Existen métodos instrumentales para la medición de textura, en los cuales, el alimento es deformado mediante la aplicación de una compresión, tensión, corte o la combinación de estos tres parámetros. Asimismo, algunas evaluaciones toman lugar antes de que el alimento es ingerido ya que se juzga por la apariencia y la sensación remanente a través de su manipulación (Bourne, 1978).

Un análisis común en productos gelificados es el perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés), este ensayo comprende la compresión de una muestra en dos ciclos, imitando el proceso de masticación (Pilosof, 2000). Dihort-García y col. (2011), estudiando el efecto de la disolución alcalina del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en su habilidad de formación de gel, encontraron que los geles elaborados con proteínas recuperadas mediante disolución alcalina mostraron mejor capacidad gelificante en comparación con el control, ya que se obtuvieron geles más duros y menos quebradizos. No obstante, Cortes-Ruíz y col.

(2008) estudiando la disolución ácida de proteínas de la misma especie, encontró aún mejores propiedades gelificantes en comparación con el control y con lo reportado por Dihort-Garcia y col. (2008).

### Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) de una proteína, es la habilidad de retener toda o parte del agua propia del sistema, es aún más importante que su capacidad de hidratación en aplicaciones alimentarias. (Honikel, 2009). Los métodos de medición se basan en la aplicación de una fuerza externa (presión o centrifuga), finalmente se determina la cantidad de agua liberada por el gel. La capacidad de retención de agua de las proteínas se ve influida por varios factores, tales como: pH, fuerza iónica, tipo de sales, la temperatura, entre otros) y por la conformación proteica (Xiong, 1997).

En este sentido, Sánchez-González y col. (2008), al determinar la CRA en geles obtenidos de surimi de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), encontraron un incremento significativo de la CRA en los geles comparada con la del surimi o soles. También reportan que la CRA obtenida fue mayor a la reportada por otros autores como Sánchez-Alonso y col. (2006), que lo atribuyeron a los diferentes métodos de medición.

Kang y col. (2008) estudiaron el efecto de la concentración de sal residual y contenido de fosfatos en surimi de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) después de 9 ciclos de congelación-descongelación. Encontrando que en general, la habilidad de retener agua decrece conforme se extienden los ciclos de congelación, especialmente cuando se comparan 0 y 9 ciclos de congelación-descongelación.

## Caracterización Microestructural

### Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Un microscopio electrónico de barrido se encuentra adecuado para producir una imagen de alta resolución mediante la detección de electrones secundarios y electrones retrodispersados, generados a partir de una muestra a bajo voltaje de aceleración (Todokoro y Ezumi, 1999). Esta técnica es de gran utilidad en la observación de agregados proteicos, o en determinar el tipo de asociación que hay en una red proteica. En este sentido, Romero y col. (2009) estudiaron el potencial de concentrados proteicos de cangrejo de río para la producción de análogos de surimi. Emplearon SEM para evaluar el efecto del pH en la microestructura de los geles obtenidos, encontrando una fuerte dependencia del pH en la microestructura. En general todas las imágenes de SEM muestran una estructura de red tipo esponja con agregados proteicos similares a un talón o cuenca, estos agregados son mas grandes al pI en ausencia de interacciones electrostáticas, mientras que a pH alcalino las interacciones electrostáticas son predominantes siendo más pequeños los agregados proteicos aunque conservan su apariencia de esponja.

Sánchez-González y col. (2008) al estudiar los cambios estructurales de las proteínas y agua durante la gelificación en surimi de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), observaron que el tamaño promedio de las cavidades que pueden encerrar agua, son pequeñas en los geles, al compararse con las del surimi, lo cual es consistente con la alta capacidad de retención del agua.

### Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

En una microscopia electrónica de transmisión convencional un espécimen delgado se irradia con una corriente de electrones de densidad de corriente uniforme (Reimer y Kohl, 2008). Al igual que la técnica anterior, ésta es de gran utilidad en la observación directa de las microestructuras formadas en los geles, las cuales determinan las características físicas y químicas de un gel, así como la calidad del mismo.

Riebroy y col. (2009) investigaron la microestructura de geles de actomiosina natural (NAM) de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y lota (*Lota lota*). Revelaron que bajo condiciones ácidas ocurre una agregación en los geles inducidos térmicamente, además, que exhiben una red tipo filamento y que estos fueron más grandes y gruesos en lota que en bacalao. Hsu y col. (2007) emplearon TEM para obtener información acerca de los cambios en la forma de los filamentos de NAM extraída de tilapia (*Oreochromis niloticus*), causados por tratamientos de presión. Encontraron una estructura de cabeza de flecha característica en los filamentos de NAM, esta estructura fue observada aun después del tratamiento a presión a 50 MPa por 60 min. No obstante a presiones superiores los filamentos fueron acortados, probablemente debido a la disociación de subunidades de miosina y depolimerización de la actina. Finalmente a 250 MPa la NAM forma agregados y pierde esta estructura.

### Calorimetría de barrido diferencial (CBD)

La CDB puede ser empleada para el estudio de proteínas, lípidos así como hidratos de carbono. Esta técnica permite el análisis de transiciones de primer orden, como la desnaturalización de proteínas; así como transiciones de segundo orden, como temperaturas de transición vítrea y capacidad calorífica (Añón y Jovanovich, 2000). En la desnaturalización de

las proteínas la CDB permite estudiar los efectos de la composición del medio (sales, ácidos, azúcares, polisacáridos, etc.) y caracterizar el grado de desnaturalización ocurrido bajo diferentes condiciones de gelificación (Pilosof, 2000).

Entre las proteínas miofibrilares, la miosina y actina son críticas para la gelificación térmica. Taskaya y col. (2009) investigaron la desnaturalización térmica de las proteínas recuperadas de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) y abadejo de Alaska, encontrando que la desnaturalización de la miosina y actina ocurre a los 39°C y 75°C, respectivamente, en la carpa plateada, mientras que en el abadejo de Alaska la miosina y actina se desnaturalizan entre 41-44 °C y 73-75°C, respectivamente. También se reportó que la miosina requiere mayor energía calorífica ( $\Delta H$ ) que la actina para la transición en ambas especies, estas diferencias pueden ser asociadas al ambiente de su hábitat entre las especies.

Otros estudios realizados por Riebroy y col. (2008) muestran resultados similares al estudiar las propiedades fisicoquímicas de miosina extraída de bacalao del Atlántico (*Gardus morhua*) y Burbot (*Lota lota*), ya que observaron temperaturas de transición de 37.6 y 38.8 °C, respectivamente, lo cual resulta subsecuentemente en interacciones proteína-proteína y formación de agregados, indicando que ambas miosinas son estables al tratamiento térmico. Sin embargo, observaron un descenso en la temperatura de transición y en  $\Delta H$  después de la acidificación con ácido D-glucono- $\delta$ -lactona (GDL), lo cual se asocia con la alteración del orden conformacional ya que se requiere menor temperatura y energía para completar la desnaturalización.

## Caracterización Molecular

### Dicroísmo circular (DC)

Los estudios de DC son particularmente útiles para el estudio de moléculas quirales. En las proteínas los espectros de DC contienen información acerca de la asimetría del esqueleto polipeptídico, así como también de la orientación de las cadenas laterales. Actualmente el principal uso del DC en el estudio de las proteínas es un indicador empírico de la estructura proteica y la conformación, induciendo cambios en esqueleto amida de ~190 nm a 240 nm. El espectro distintivo DC ha sido descrito para conformaciones puras como hélice- $\alpha$ , hoja- $\beta$ , giros- $\beta$  y también ordenamiento al azar (random coil) (Rodger y Nordén, 1997).

Raghavan y Kristinsson (2007) monitorearon los cambios en la estructura secundaria y terciaria de miosina extraída de bagre (*Ictalurus punctatus*) en rangos de 190-260 nm y 260-350 nm, respectivamente. Respecto a la estructura secundaria, encontraron que cuando la sal se agregó antes del desplegamiento el contenido de  $\alpha$ -hélice de miosina tratada a pH de 1.5 fue significativamente menor que la tratada a pH de 2.5, mientras que cuando la sal es agregada después del replegamiento el contenido de  $\alpha$ -hélice no se afecta. En lo referente a la estructura terciaria, cuando la sal se agregó antes del desplegamiento la miosina se somete a una menor desnaturalización, comparada con las muestras que se adicionó sal durante el replegamiento. Esto mostró que la adición de sal antes del replegamiento tiene un efecto protector contra la desnaturalización comparada con los tratamientos en los que se adicionó sal después del tratamiento ácido.

Liu y col. (2010), emplearon dicroísmo circular para monitorear los cambios en la estructura secundaria de la miosina extraída de carpa plateada (*H. molix*), observaron que su estructura secundaria se afectaba por efecto del pH y temperatura. Además, observaron la

predominancia de  $\alpha$ -hélice a pH neutro; sin embargo, ésta mostró una reducción al variar el pH desde 7.0 a 5.0 y 9.0. Por otra parte, el efecto de la temperatura en la estructura fue notado por un descenso gradual del 94 al 34.5% de la fracción de la  $\alpha$ -hélice al incrementar la temperatura de 5 a 90 °C, en tanto que, el ordenamiento al azar se reporta que incrementa con el incremento de temperatura. Estas transformaciones juegan un papel importante durante la gelificación, determinando las características físicas y químicas de los geles proteicos.

#### Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF) es una medición de la longitud de onda y la intensidad de absorción de la radiación infrarroja por la muestra, el espectro obtenido de los polímeros son generalmente interpretados en términos de vibraciones de una estructura repetida. Los polipéptidos y proteínas dan unidades de repetición características del espectro de absorción IR, llamadas amida A,B y I-VII. De estas, las bandas de amida-I y amida-II son las más destacadas del esqueleto polipeptídico (Kong y Yu, 2007).

La espectroscopia IR-TF puede ser usada para el análisis de conformación en péptidos en una amplia variedad de ambientes. En este sentido, Bertram y col. (2006), emplearon de forma combinada la espectroscopia de IR-TF y  $^1\text{H}$  NMR  $T_2$  de bajo campo relaxometría, para caracterizar los cambios en las estructuras de proteínas miofibrilares y las propiedades químicas-físicas del agua ocluida en la matriz de proteínas miofibrilares debido al calentamiento de la carne (*M. longissimus dorsi*) y la influencia en la calidad de la carne fresca en estos cambios. Bertram y col. (2006), encontraron una banda a 1652  $\text{cm}^{-1}$ , la cual decrece con el incremento de temperatura, que se refiere más probablemente al enlace C=O en la

estructura de hélice- $\alpha$  de proteínas miofibrilares, asignaron bandas a  $1685\text{ cm}^{-1}$  (alta frecuencia) y  $1639\text{ cm}^{-1}$  (baja frecuencia) que tentativamente representan a estructuras de hoja- $\beta$  nativa (intramolecular).

Por otra parte, Tolano-Villaverde (2010) al estudiar los cambios conformacionales de un concentrado proteico alcalino de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) mediante espectroscopia IR-TF, no observó disminución en la intensidad de la banda característica de grupos S-H y aumento de la banda S-S de estos sistemas, por lo que concluyó que no hubo formación de enlaces disulfuro durante la transición sol-gel.

#### Contenido de sulfhidrilo total (SHT)

Los aminoácidos cisteína y cistina contienen grupos sulfhidrilo (SH) y disulfuro (SS), respectivamente. Estos grupos intervienen significativamente en las propiedades funcionales de las proteínas, ya que participan en la formación de estructuras relativamente rígidas en los geles debido a la conversión de SH a S-S (Marín-Martínez, 2002). Durante la transición sol-gel, en las primeras etapas del calentamiento ocurre el desplegamiento proteico, lo cual, repercute en un aumento en la exposición de grupos SH libres. Posteriormente, alrededor de los  $50\text{-}55^{\circ}\text{C}$  los grupos sulfhidrilos libres pueden reaccionar entre ellos, formando enlaces disulfuro, que brindan fuerza y estabilidad al gel (Yongsawatdigul y Park, 2004). Una disminución en el contenido de SH totales es consecuencia de la formación de S-S.

Thawornchinsombut y Park (2007), evaluaron el efecto combinado del pH y la concentración de NaCl en un CP de merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) obtenido mediante disolución ácida/alcalina, también compararon el contenido de SH con respecto al surimi convencional elaborado a partir de la misma especie. De lo anterior, encontraron que a alto

pH pueden presentarse reacciones de oxidación de tioles entre los –SH expuestos o que los grupos S<sup>-</sup> pueden participar en reacciones de intercambio de disulfuro, puesto que los cambios en la concentración de NaCl no tienen efecto significativo en el contenido de SH en tanto que bajo condiciones alcalinas en todas las concentraciones de NaCl empleadas, el contenido de SH fue significativamente menor que el surimi convencional, lo que indica que los grupos SH comienzan a ser más susceptibles a la oxidación, resultando en la formación de enlaces en la formación de la red del gel.

Aunque el contenido de enlaces SH y S-S son comúnmente asociados a la gelificación de proteínas musculares, Ingadottir y Kristinsson (2010), encontraron que no hubo formación significativa de enlaces S-S durante el calentamiento para la formación del gel, cuando fueron comparadas las propiedades de los geles preparados con proteína muscular de tilapia aislada mediante la disolución ácida y alcalina, contra los geles elaborados con proteína muscular de tilapia extraída mediante ciclos de lavado. Por consiguiente Ingadottir y Kristinsson (2010), determinaron en su estudio, que las diferencias halladas en los grupos SH no pueden explicar la funcionalidad de las proteínas.

#### Determinación de la hidrofobicidad de superficie

La hidrofobicidad de superficie de las proteínas influye en interacciones intermoleculares, tales como la unión a pequeños ligandos o la asociación con otras moléculas, incluyendo interacciones proteína-proteína o proteína-lípido. El contenido de aminoácidos hidrofóbicos es dependiente de parámetros hidrofóbicos, electrónicos y estéricos, su ubicación espacial en la proteína se ha relacionado con sus propiedades funcionales. Los aminoácidos hidrofóbicos

suelen localizarse al interior de la proteína, no obstante debido a impedimentos estéricos algunos se encuentran al interior de la misma (Haskard y Li-Chan, 1998).

Las interacciones hidrofóbicas son las interacciones no covalentes que más contribuyen a la estabilidad conformacional de las proteínas. Son favorecidas por el aumento de la temperatura y por la entropía, la fuerza de este tipo de interacciones aumenta con el incremento de temperatura hasta alcanzar los 100 °C (Privalov y col., 1986)

Las pruebas más comunes empleadas para mediciones de hidrofobicidad son las espectrofluorométricas, utilizando moléculas como: el 1-anilinaftaleno-8-sulfonato de magnesio o amonio (ANS<sup>-</sup>), ácido cis-parinárico (CPA), PRODAN, entre otros. El principio de estos métodos es la escasa fluorescencia de los compuestos en soluciones acuosas y el gran incremento que ocurre al ligarse las regiones hidrofóbicas de las proteínas con el compuesto(Haskard y Li-Chan, 1998).

Thawornchinsombut y Park (2007),estudiaron el efecto combinado del pH y NaCl en el concentrado proteico (CP) ácido-alcalino de merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) y lo compararon con el surimi elaborado de la misma especie, evaluando las propiedades gelificantes, fisicoquímicas y composición proteica. En este estudio, encontraron que los geles elaborados mediante el método convencional del surimi muestran el menor valor de superficie hidrofóbica aunque el contenido de sal es comparable con el CP alcalino o ácido a 400 mM, lo que indica que la solubilización química y precipitación de las proteínas aún a baja concentración causa más desplegamiento que el proceso convencional de surimi, por otra parte, un incremento en la concentración de NaCl de 10- a 150 mM incrementa dramáticamente el desplegamiento proteico, mientras que al incrementarla concentración a 400 mM, no se observa cambio significativo.

### Perfil electroforético (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) es muy utilizada en la determinación de hidrólisis o agregación proteica (Shi y Jackowski, 2002). Por consiguiente, es posible observar mediante un gel de electroforesis el efecto en el peso molecular de proteínas musculares, debido a variables como la fuerza iónica, pH, temperatura, entre otros, así mismo es posible elucidar al emplear diferentes condiciones (nativa o reductora) la naturaleza de los enlaces formados.

El peso molecular crítico de un polímero para la formación de un gel es de aproximadamente 230 kDa. La estabilidad del gel formado depende de la naturaleza y número de entrecruzamientos formados por las cadenas del polímero. Teóricamente, un gel será más estable cuando la suma de las energías de interacción de una cadena polimérica sea mayor que su energía cinética a una temperatura dada. Esto explica que los geles formados a partir de cadenas poliméricas largas sean más estables que los formados a partir de cadenas cortas (Wang y Damodaran, 1970)

Con el objetivo de obtener una mejora en las propiedades gelificantes y sensoriales en CP de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), Sánchez-Alonso y col. (2007), elaboraron concentrados proteicos mediante la solubilización del manto a muy baja fuerza iónica empleando pH neutro con 25 ppm de EDTA y precipitación ácida (pH 4.7-4.9). Del patrón electroforético obtenido durante las diferentes etapas de elaboración del concentrado, Sánchez-Alonso y col. (2007), encontraron que la degradación de las bandas parece no ser meramente consecuencia de la solubilización, de cualquier forma se encontró que después de la precipitación existe un engrosamiento de la banda de meromiosina pesada (MMP) producida por la degradación de cadena pesada de miosina (CPM).

## **HIPÓTESIS**

Las propiedades gelificantes de un concentrado de proteínas miofibrilares obtenidas de manto de calamar gigante serán mejoradas mediante el aumento en la fuerza iónica a pH por encima de su punto isoelectrico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del pH y concentración de NaCl sobre la propiedad gelificante de un concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar el rendimiento del concentrado proteico miofibrilar del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) elaborado mediante un ciclo de lavado.
- Evaluar los cambios estructurales y conformacionales de las proteínas obtenidas del CP en soles por efecto de la adición de NaCl e incremento de pH.
- Evaluar las propiedades gelificantes de las proteínas recuperadas por efecto de la adición de NaCl e incremento de pH.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

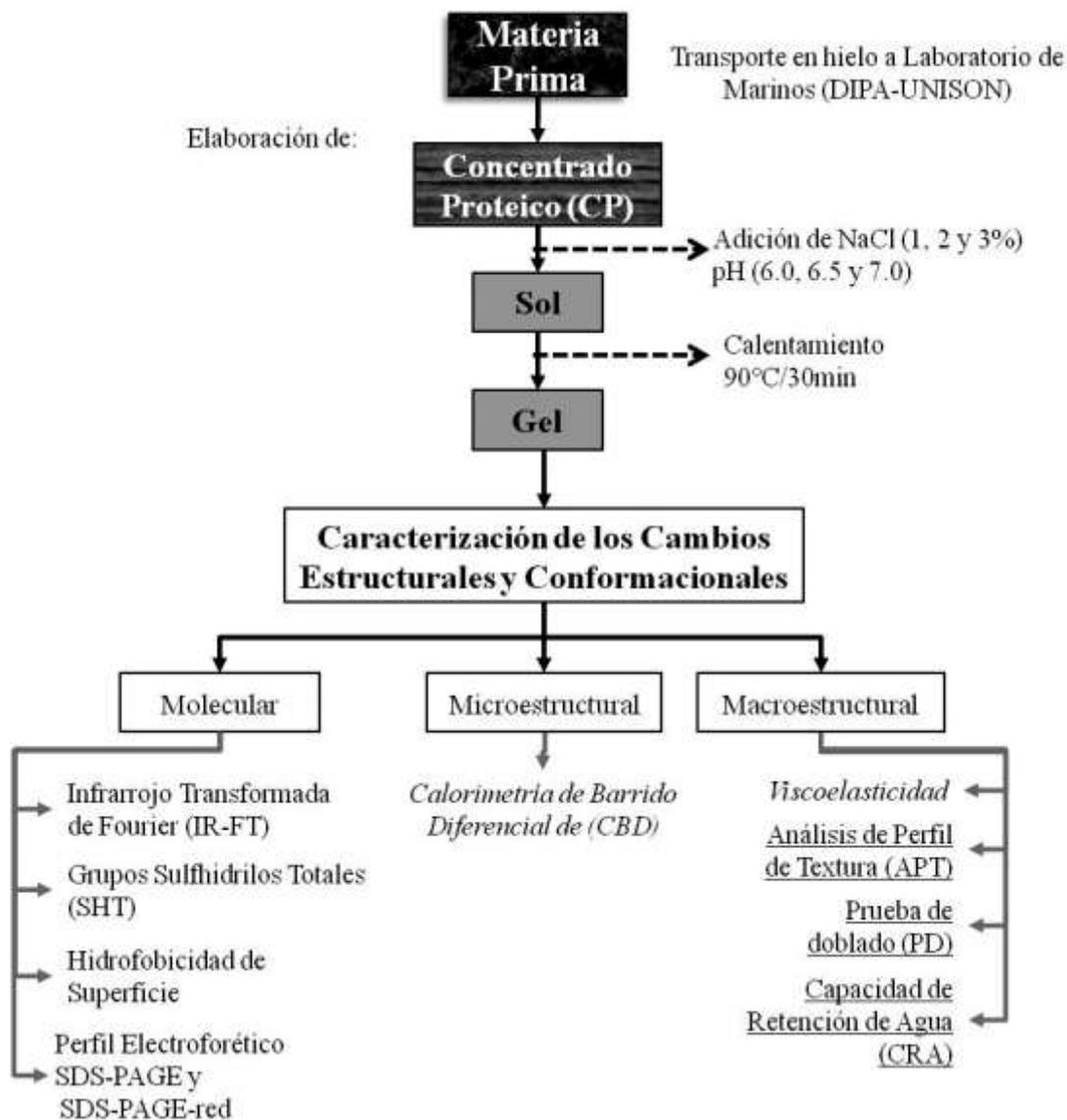
### **Materia Prima**

Se utilizó calamar gigante (*Dosidicus gigas*), el cual fue capturado en Mayo del 2012, en las costas de Bahía Kino, Sonora. Los especímenes capturados tuvieron una longitud de manto promedio de  $31.6 \pm 2.5$  cm y un peso de  $757 \pm 7.50$  g. Los organismos se evisceraron y colocaron dentro de una hielera hermética, en camas alternas de hielo-calamar-hielo para su traslado al Laboratorio de Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. Una vez arribado, los organismos fueron inmediatamente desprovistos de su piel, lavados y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

El procedimiento general para la obtención del concentrado proteico para la elaboración de geles y caracterización de sus cambios estructurales y conformacionales se muestra en la Figura 3.

### **Elaboración del Concentrado Proteico (CP)**

Se descongeló el calamar a  $5^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Enseguida el manto fue picado y homogeneizado utilizando agua destilada refrigerada ( $4-6^{\circ}\text{C}$ ) en una razón de 1:3 (musculo: agua). La suspensión obtenida fue centrifugada a  $16000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , enseguida se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se centrifugó tres veces de la misma forma. Durante el lavado se pierden las proteínas sarcoplásmicas en la fracción soluble, mientras que en el precipitado obtenido, que es considerado como el concentrado proteico, se encuentra principalmente miosina.



Texto en cursiva indica que las técnicas fueron aplicadas en soles de CP  
 Texto subrayado indica que las técnicas fueron aplicadas en geles de CP  
 Las técnicas restantes fueron determinadas en soles y geles de CP

**Figura 3.** Diagrama para la elaboración del concentrado proteico para la obtención de geles y caracterización de sus cambios estructurales y conformacionales.

## **Elaboración de Soles y Geles**

A partir del concentrado proteico obtenido se prepararon los diferentes soles mediante la adición de NaCl al 1, 2 y 3%. Posteriormente se ajustó el pH del concentrado a 6.0, 6.5 y 7.0 utilizando para ello  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . El sol obtenido fue colocado en placas Petri de vidrio (con una altura de 1 cm) y empacado en bolsas de polietileno de baja densidad. Para la formación del gel estos se calentaron a  $90^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Inmediatamente después los geles se enfriaron a  $0-2^\circ\text{C}$  en un baño de agua-hielo y finalmente almacenados en refrigeración por 24 horas antes de proceder a su evaluación funcional.

## **Caracterización de los Cambios Estructurales y Conformacionales de Soles y Geles**

### **Caracterización Macroestructural**

#### Viscoelasticidad

Mediante estudios reológicos es posible comprender la deformación y el flujo de los alimentos bajo condiciones específicas, en las cuales en ocasiones los alimentos exhiben la habilidad de fluir o acumular deformaciones e incluso ambas. En el presente experimento, se determinaron las medidas reológicas dinámicas en cada uno de los soles, de acuerdo al procedimiento descrito por Yoshida y col. (2003). Se empleó una separación de 2 mm y un plato plano paralelo de 25 mm, en el cual se colocó la muestra cubriéndose con excedente de la misma. Se monitoreo continuamente el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) a una frecuencia fija de 3.14 Hz como una función del incremento en la temperatura de 5 a  $90^\circ\text{C}$  a una velocidad de calentamiento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ .

### Análisis de perfil de textura (APT)

Este análisis usualmente se realiza como un complemento a la prueba de doblado, para evaluar de manera objetiva la calidad del gel, registrando la fuerza necesaria para comprimir la muestra (dureza), la fuerza necesaria para producir la primera liberación de energía durante el ciclo de compresión (fractura), la elasticidad como la relación de la base del segundo ciclo de compresión sobre la del primero y finalmente la cohesividad, determinada por la relación del área del segundo ciclo de compresión sobre la del primero. Para este análisis, los geles se cortaron en porciones cubicas (1 cm x 1 cm) y se templaron a temperatura ambiente durante 30-40 minutos antes de su análisis. Enseguida las muestras de geles fueron sometidas a una doble compresión al 75% en un Texturómetro TA-TX2 plus utilizando una celda de compresión de 3.8 cm de diámetro a una velocidad de 1 mm/s.

### Prueba de doblado (PD)

La prueba de doblado, es una prueba común en la industria del surimi para la evaluación rápida de la calidad del gel. Se trata de una determinación subjetiva que se correlaciona con los datos obtenidos de forma objetiva en el APT. Esta determinación se realizó en geles de CP, de acuerdo a la técnica propuesta por Tanikawa y col. (1985), la cual consiste en doblar dos veces por la mitad rebanadas de 3 mm de altura por 30 mm de diámetro. De acuerdo a su comportamiento al doblado se le asignó un valor utilizando la siguiente escala (Lanier, 1992): Calidad 5(AA) – sin quebrarse cuando se dobla en cuadrantes, 4(A) – sin quebrarse cuando se dobla por la mitad, 3(B) – presenta gradual desarrollo de quiebre al doblar por la mitad, 2(C) – ocurre un quiebre inmediato cuando se dobla por la mitad o 1(D) – se desmorona cuando se presiona con los dedos.

### Capacidad de retención de agua (CRA)

La CRA, es un importante factor en los geles de proteína muscular ya que no solo afecta en el sentido económico de su producción, sino también en calidad, en particular en alimentos con estructuras fibrosas, ya que es un factor importante para su jugosidad y masticabilidad. Esta determinación fue evaluada en geles, empleando la técnica propuesta por Jiang y col. (1985) utilizando una muestra de 5 g. Ésta fue sometida a una fuerza centrífuga de  $3000 \times g$  por 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una centrífuga refrigerada. Se expresó como porcentaje de agua retenida en relación a la cantidad de agua total presente en la muestra antes de centrifugar.

### **Caracterización Microestructural**

#### Calorimetría de barrido diferencial (CBD)

Mediante esta técnica es posible determinar la capacidad calorífica de las proteínas en función de la temperatura, asimismo, es posible estudiar la estabilidad proteica debida a interacciones inter e intra moleculares. Dependiendo de la complejidad del material se detectan picos o inflexiones que reflejan transiciones inducidas térmicamente. La CBD puede ser también empleada para evaluar el efecto de una variable física o química por la comparación de los termogramas (Kaletunç, 2009).

Para este estudio se tomaron 40 mg de los diferentes soles y se colocaron en una celda calorimétrica asegurándose del buen contacto entre la muestra y la cara inferior de la capsula. Todas las muestras se escanearon a una velocidad de calentamiento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  en el rango de  $4\text{-}110\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se monitoreo la temperatura ( $T_m$ ) y la entalpía ( $\Delta H$ ) de desnaturalización.

## **Caracterización Molecular**

### Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (IR-TF)

En el espectro infrarrojo, la región de absorción de la amida I ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) es una de las regiones más útiles para la elucidación de la estructura secundaria, la cual se debe casi por completo a las vibraciones debidas al estiramiento del enlace C=O de los enlaces peptídicos (Krimm y Bandekar, 1986). Para este análisis se liofilizaron 5 g de cada uno de los soles y geles (Labconco, modelo Freezone 4.5 Buenos Aires, Argentina). Posteriormente se pesaron 3 mg de cada una de las muestras liofilizadas y se mezclaron con 35 mg de bromuro de potasio (KBr) para hacer la pastilla. El análisis se llevó a cabo en un rango de  $370\text{ a }7800\text{ cm}^{-1}$  (Perkin Elmer, modelo Spectrum GX, Washington D.C.).

### Contenido de sulfhidrilo total (SHT)

Los sulfhidrilos totales (SHT) representan la totalidad de los grupos tioles presentes en las proteínas, es decir, aquellos que se encuentran en la superficie e interior de la proteína. A pH levemente alcalino, ocurre una reacción de intercambio de disulfuro entre la proteína y el DTNB, lo cual produce un tiofenolato de color intenso en cantidad equivalente a la cantidad de grupos tiol presente en la proteína, este compuesto, el 3-carboxi—4-nitro-tiofenolato mesomérico es determinado espectrofotométricamente a 412 nm.

La determinación del contenido de SHT fue realizada en las proteínas de soles y geles. Para ello se disolvieron en buffer tris-HCl una concentración de 0.6% de proteína. Se tomó 1 mL de muestra y se le añadieron 1.44 g de urea, enseguida se añadió 1 mL de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a una concentración de 2 mM (preparado en buffer de fosfatos a pH de 6.0, 6.5 y 7.0, respectivamente), posteriormente se dejó reposar 40 min para desarrollar color.

Se ajustó el volumen a 7 mL, permaneciendo la solución a temperatura ambiente hasta su análisis. Se tomó el sobrenadante y se registró la absorbancia a 412 nm. La concentración en la solución fue calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de  $13,600/M/cm^{-1}$  (Patrick y Swaisgood, 1976).

### Hidrofobicidad de superficie

La hidrofobicidad es la tendencia de dos solutos no polares adherirse entre sí en un ambiente acuoso, además, este tipo de interacciones no covalentes son las que más contribuyen a la estabilidad conformacional de las proteínas. La medición de la hidrofobicidad de superficie de la proteína, se relaciona con el incremento en la fluorescencia observada, este incremento es debido a que las regiones hidrofóbicas de la proteína se encuentran accesibles para interactuar con el compuesto no polar 1-anilino-8-naftaleno sulfonato(ANS).

Las proteínas de soles y geles se disolvieron en buffer tris-HCl a una concentración de 1.2% de proteína. Estas soluciones se diluyeron para proveer una concentración de proteína de 0.02, 0.03, 0.05 y 0.06%. Enseguida se adiciono ANS a una concentración de 15 mM. Posteriormente 3 mL de la muestra se excitaron a 325 nm, midiendo la intensidad de la fluorescencia a 420 nm. El índice de hidrofobicidad de superficie ( $S_0$ ) resultó de la pendiente del grafico de intensidad de fluorescencia vs concentración de proteína, según Kato y Nakai (1980).

### Perfil Electroforético (SDS-PAGE)

La electroforesis es un método analítico, en el que se separan biomoléculas en función de su tamaño. El perfil electroforético de las proteínas de cada sol y gel fue determinado empleando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970) en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE por sus siglas en inglés). Cada uno de los sistemas proteicos se mezcló en relación 1:1 (v/v) con buffer muestra. Enseguida se calentaron en agua a ebullición durante 5 minutos y se enfriaron en un baño de hielo, para su posterior análisis electroforético.

Se aplicaron 20 µg de proteína a un gel de poliacrilamida al 10%, empleando una unidad para electroforesis Mini PROTEAN<sup>®</sup>3 Cell Multi-casting (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Se utilizó una mezcla de proteínas estándar de amplio rango (Bio-Rad), compuesta por las siguientes proteínas: cadena pesada de miosina (200 kDa), β-Galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (31 kDa). La corrida de electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a un voltaje de 120 volts. Finalmente, las bandas se tiñeron con azul Coomassie al 0.05% y se destiñeron en una solución de metanol al 40 % y ácido acético al 7%.

## **Diseño Experimental**

En este experimento se utilizó un arreglo factorial con dos efectos principales. El efecto principal A, pH con 3 niveles (6.0, 6.5 y 7.0) y el efecto principal B, concentración de NaCl con 3 niveles (1.0, 2.0 y 3.0%). Las variables respuestas empleadas fueron resultado de la determinación de las propiedades viscoelásticas ( $G'$ ), textura (dureza, fractura, adhesividad, elasticidad, cohesividad), CRA, desnaturalización térmica de las proteínas ( $T_m$  y  $\Delta H$ ), contenido de SHT (concentración de SHT, moles/ $10^5$  g) e hidrofobicidad superficie de las proteínas (intensidad de la fluorescencia). En los casos en que fue requerido, se realizaron comparaciones múltiples de Tukey usando un nivel de significación del 5%. Finalmente, los datos fueron analizados usando el programa JMP versión 5.0.1.

Cabe mencionar, que en el caso de las determinaciones en los cambios en la estructura secundaria analizados mediante IR-TF y perfil electroforético, no se precedió alguna determinación estadística puesto que los valores reportados son resultado de una sola determinación.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Rendimiento

En el presente estudio se obtuvo un rendimiento de  $58.68 \pm 8.72\%$  al elaborar el CP, con una humedad del  $90.58 \pm 2.62\%$ , utilizando un solo ciclo de lavado (Tabla 1). El proceso estándar para la obtención de concentrados proteicos se basa en la utilización de varios ciclos de lavado, con la finalidad de una mejor remoción de proteínas sarcoplásmicas, pigmentos, lípidos e impurezas. Sin embargo, debido a las características inherentes del músculo del calamar, entre las que destacan su alta solubilidad proteica (fácil remoción de proteína sarcoplásmica), la inexistencia de pigmentos, magro y sin escamas ni espinas, se optó por utilizar un solo ciclo de lavado (Encinas, 2011). Se ha reportado que el rendimiento proteico puede variar en función del método de extracción utilizado, en este sentido, Dihort-García y col. (2012) utilizando la disolución alcalina en manto de calamar (*Dosidicus gigas*) reportaron un rendimiento del  $43.87 \pm 2.11\%$ , una recuperación similar a la encontrada por Cortés-Ruiz y col. (2008), quienes aplicando una disolución ácida reportaron una recuperación del  $48.2 \pm 6.0\%$  de la proteínas totales. Por consiguiente, la modificación del proceso tradicional para la elaboración de CP, resulta en una mayor recuperación de proteínas, al ser comparado con otros métodos de extracción empleado la misma especie.

**Tabla 1.** Comparativo del rendimiento de la obtención con un ciclo de lavado del concentrado proteico de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con el de otros tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>% Rendimiento</b>	<b>Referencia</b>
1 Ciclo de lavado	$58.68 \pm 8.72^*$	Dato experimental
Disolución alcalina (pH=10)	$43.87 \pm 2.11$	Dihort-García y col. (2012)
Disolución ácida (pH=3.2)	$48.2 \pm 6.0$	Cortés-Ruiz y col. (2008)

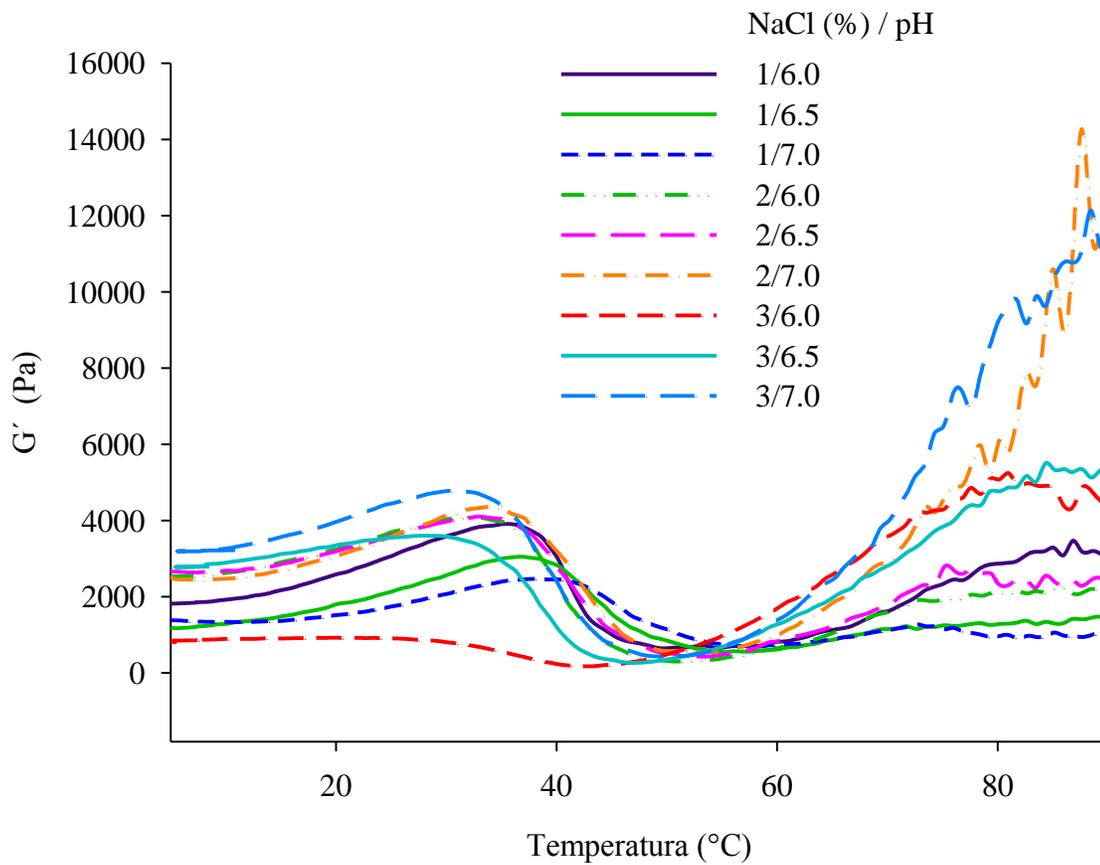
\* Los valores presentados son promedio de tres determinaciones.

## Caracterización Macroestructural

### Efecto sobre la Viscoelasticidad

La comprensión de los efectos del pH y concentración de NaCl puede ayudar a mejorar las propiedades del gel. Los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) obtenidos en las mediciones dinámicas oscilatorias representan la elasticidad y viscosidad, respectivamente, de un material viscoelástico. En el presente estudio, existió un predominio del comportamiento elástico sobre el viscoso, por lo que a continuación sólo se discute el módulo de almacenamiento ( $G'$ ).

En la Figura 4, se muestran los cambios en el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) durante el calentamiento de las proteínas encontradas de los soles de CP. Se inició el ciclo de calentamiento con una temperatura de 5 °C, a partir de la cual se muestra un incremento continuo en el módulo elástico hasta encontrarse entre los 26.33 a 40.39 °C, enseguida  $G'$  desciende ligeramente hasta alcanzar un valor mínimo en el intervalo de 43.34 a 63.95 °C. El primer aumento de la elasticidad se ha atribuido al entrecruzamiento de la miosina y la caída posterior, a la desnaturalización de la meromiosina ligera que causa una fluidez. El segundo aumento de la elasticidad se ha atribuido a la formación de una red permanente de los filamentos de miosina (Xiong, 1997) Estos cambios pueden ser debidos a la disociación de las cadenas ligeras de las cadenas pesadas, resultando en cambios conformacionales de la molécula. Por otra parte el entrecruzamiento de la miosina puede ser también responsable del incremento en  $G'$  puesto a que se forma una red elástica. El subsecuente descenso se ha supuesto que se relaciona con la disociación del complejo actina-miosina y desplegamiento de la hélice- $\alpha$  de la porción de varilla de miosina (Xiong y Blanchard, 1994).



**Figura 4.** Módulo de almacenamiento desarrollado durante el calentamiento de las proteínas de soles de CP de calamar gigante a sus respectivos tratamientos.

La desnaturalización térmica de la miosina y actina, pueden ser estudiadas mediante la medición de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ). En este sentido, se presenta una mayor temperatura de desnaturalización en el sol del CP al que se ajustó el pH a 7.0 y que se adicionó 1% de NaCl, lo cual puede ser bien relacionado con la  $T_m$  obtenida en CBD (Tabla 3), en la que se obtiene la mayor  $T_m$  y  $\Delta H$  en este tratamiento, pudiendo inferir entonces acerca de su estabilidad térmica.

Varios estudios han reportado que las proteínas miofibrilares, especialmente la miosina y actina, son las responsables de la gelificación. También se piensa que la cadena pesada de miosina es la principal subunidad involucrada en la gelificación, en lo que respecta a las cadenas ligeras parece ser que su rol es dependiente de la fuerza iónica, ya que altas fuerzas iónicas pueden ser menos importantes que a bajas fuerzas iónicas (Xiong, 1997).

Las diferencias observadas en magnitud de  $G'$  se debieron a las diferentes concentraciones de NaCl y pH. Ogawa y col. (1995), reportaron un pequeño descenso del valor de  $G'$  comenzando a 25 °C indicando el desplegamiento de la hélice- $\alpha$  de las moléculas de miosina en la parte de la cola. Siegler y Acton (1984) reportaron que el calentamiento de actomiosina a temperaturas menores de 40 °C generalmente resultan en la disociación de algunos componentes miofibrilares, por ejemplo la disociación de tropomiosina del esqueleto de F-actina y la disociación de F-actina de su estructura de súper hélice.

La disociación del complejo actina-miosina y la desnaturalización de la meromiosina ligera conducen a un incremento en la fluidez (Egelandsdal y col. 1986). Asimismo, el desplegamiento de la miosina, probablemente causa un incremento en la fluidez de la estructura preformada del gel y puede interrumpir algunos entrecruzamientos que existen durante el estado inicial, resultando en el descenso del valor de  $G'$  (Xiong, 1997).

El valor de  $G'$  incrementa rápidamente en los tratamientos después del fenómeno de modori (ablandamiento, 60°C) y alcanza un valor entre 963 y 11518 Pa al final del ensayo. Por otra parte, Egelandstad y col., (1986), sugieren que el incremento en  $G'$  después de 47 °C sea probablemente atribuido a la formación de una red irreversible en el gel. Una mayor  $G'$  se traduce en un sistema más rígido, lo cual es favorable en el proceso de gelificación térmica.

En el presente estudio, se obtuvo mayor  $G'$  en aquellas muestras en las que el pH de los soles fue ajustado a 7.0 a una concentración de sal de 3 y 2%, lo anterior hace suponer que se obtendrá un gel más rígido en estos tratamientos, sin embargo como se muestra en el APT (Figura 5), los geles que se obtuvieron fueron quebradizos, menos duros, elásticos y cohesivos, en comparación con los otros tratamientos. No obstante, se observa un incremento en la capacidad de retención de agua (CRA) (Figura 6) al incrementar el pH tanto con al 2% como con 3% de NaCl. Lo anterior expuesto, puede ser debido a que durante el fenómeno de modori el gel se destruye irreversiblemente, resultando quebradizo y poco elástico, con una intensidad que depende de la especie de pescado.

Cabe mencionar que Rawdkuen y col. (2008), obtuvo un comportamiento similar al presente estudio, ya que al adicionar proteína de plasma de pollo obtuvo una mejora en las propiedades reológicas y texturales de los geles de merluza del Pacífico, debido a la inhibición de la degradación causada por proteínas endógenas en el surimi. Lo anterior redundó en el mejoramiento de la calidad de los geles obtenidos mediante la modificación del método convencional en comparación con los tratamientos de disolución alcalina o ácida como a continuación se mostrará (Tabla 2).

### **Efecto sobre la Textura**

Los cambios en la textura de los geles obtenidos fueron evaluados mediante el Análisis de Perfil de Textura (Figura 5) y Prueba de Doblado (Tabla 2). Según la prueba de doblado (PD), los geles elaborados a pH de 6.0 y 1 % de sal, poseen mayor calidad. Ingadottir y Kristinsson (2010), reportaron que es más conveniente trabajar a pH alcalinos y 2% de NaCl, que bajo condiciones ácidas y sin sal, para obtener características de textura adecuada en los geles.

En relación al APT (Figura 5), las diferencias observadas en los parámetros evaluados corresponden a los cambios en la concentración de NaCl y pH, excepto en la adhesividad. En el parámetro de dureza, se tiene la mayor al 1% de NaCl y pH 6.0, en este caso esta variación puede ser debida en parte a la concentración de sal (Figura 5 a). Los valores registrados, para la fractura (Figura 5 b), son resultado de un alto grado de dureza y bajo grado de cohesividad, en el presente experimento, llama la atención la falta de quiebre o fractura en los geles, excepto a pH de 7.0, independientemente de la concentración de sal, puesto que en este caso se tiene que fueron los menos cohesivos y los que presentaron menor dureza, en relación a los otros tratamientos.

Al comparar el presente estudio con otros métodos de extracción de proteínas para elaborar geles a partir de CP de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), Cortés-Ruíz y col. (2008), observaron que los geles elaborados de MC y CPN fueron más suaves que los elaborados con un concentrado proteico obtenido mediante disolución ácida, lo anterior es explicado en función del contenido de proteína, ya que el concentrado proteico ácido tuvo 7.9% más proteína que el MC y éste un 49% más de proteína que el CPN. No obstante, en el presente estudio, todos los CP asumen la misma concentración de proteína.

**Tabla 2.** Prueba de Doblado de los geles de CP de calamar gigante.

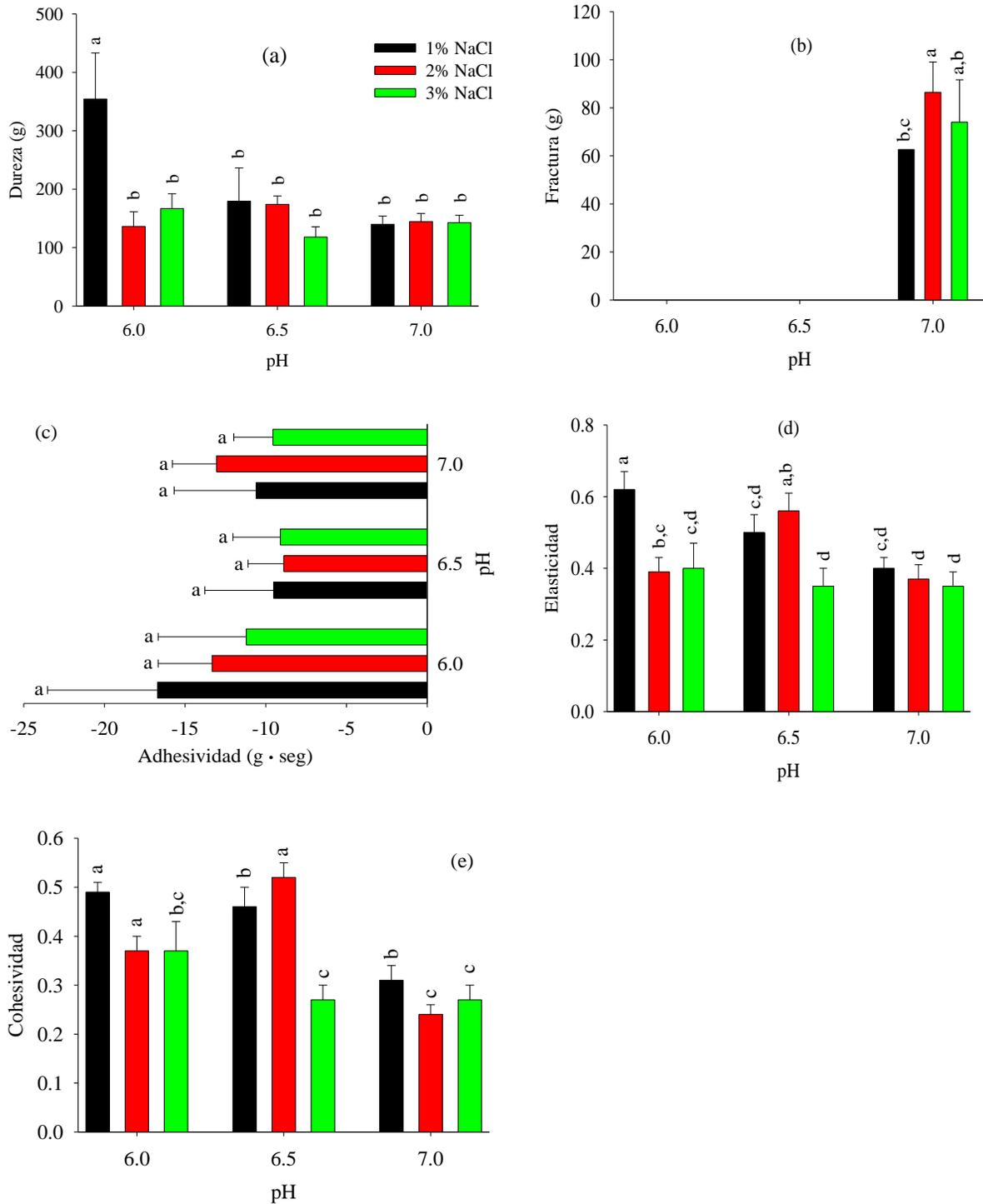
Tratamiento	
NaCl(%) / pH	Calidad
1/6.0	A-AA
1/6.5	C-B
1/7.0	C-D
2/6.0	C
2/6.5	C-D
2/7.0	C-D
3/6.0	C
3/6.5	C-B
3/7.0	C-B

Los valores presentados son promedio de cuatro determinaciones.

A través de un proceso físico llamado adhesión y cohesión, el agua se une a la partícula para formar una película delgada en su alrededor. Existe entonces, una relación entre la adhesividad y cohesividad, ya que ambas implican fuerzas atractivas, sin embargo la primera implica fuerzas atractivas entre moléculas de diferente tipo, en tanto que la segunda implica la atracción de moléculas del mismo tipo (OSC Physics Maintainer, 2012). Por otra parte la elasticidad explica el grado de deformación de la muestra al regresar a su estado inicial antes de romperse.

Al evaluar la adhesividad (Figura 5 c) en el APT no es posible encontrar diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en sus diferentes tratamientos. Se detectó mayor cohesividad (Figura 5 e) a pH de 6.0 y 6.5 a concentración de NaCl de 1 y 2% respectivamente. Lo antepuesto pudiera ser explicado en función del tipo de interacciones promovidas por efecto de la concentración de sal y pH, lo que también pudiera ser relacionado con la CRA (Figura 6) obtenida en el gel al 2% de NaCl y pH de 6.5, probablemente en estas condiciones se favorezcan interacciones electrostáticas que permitan atrapar el agua en la red tridimensional formada del gel.

Finalmente, la elasticidad (Figura 5 d) tuvo un comportamiento similar, aunque es claro que son más elásticos los geles 1% de NaCl, excepto a pH de 6.5. Las diferencias encontradas se deben a los efectos del NaCl y pH, ya que el contenido de proteína es similar en todos los sistemas. La función primaria de la sal es solubilizar las proteínas miofibrilares y subsecuentemente inducir su unión para formar el gel, por otra parte las proteínas poseen una carga neta a valores de pH diferentes al del pI, esta carga puede jugar un papel importante en el plegamiento y desplegamiento debido a la atracción o repulsión electrostática.



**Figura 5.** Análisis de perfil de textura de geles de CP a sus respectivos tratamientos.

Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar de n=4. Para cada parámetro evaluado, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

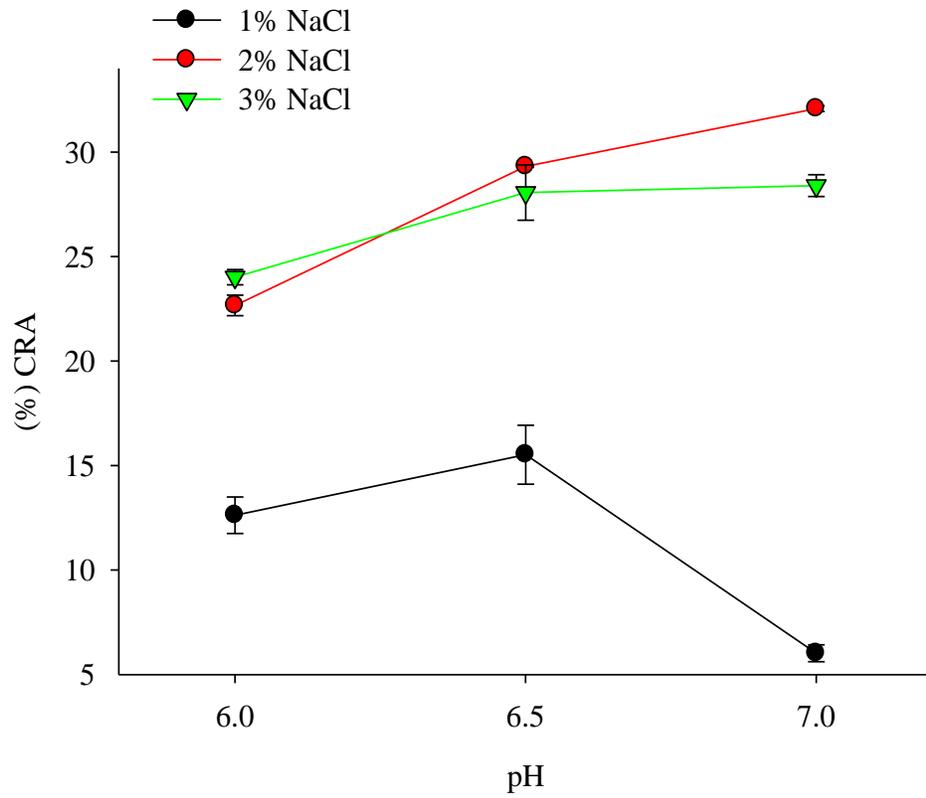
Contrariamente a lo esperado Kim y Park (2008), encontraron que las propiedades de textura de los concentrados proteicos abadejo de Alaska (*Theraga chalcogramma*) se reduce con el incremento del contenido de NaCl, especialmente del 2 al 3% de sal, ya que la sal promueve interacciones hidrofóbicas, por lo tanto, la adición de sal en los concentrados proteicos posiblemente conduzca a la agregación de proteína antes de la formación de la red en el gel.

### **Efecto sobre la Capacidad de Retención de Agua (CRA)**

Es conocido el efecto del pH en la capacidad de retención de agua, que se atribuye a la modificación de la carga neta de las proteínas miofibrilares, así como el que imparte la fuerza iónica en el desarrollo y estructura final gel, ya que influye en las características de las proteínas musculares incluyendo la gelificación inducida por calor, propiedades térmicas y capacidad de retención de agua (Bertram y col., 2004).

En la Figura 6, se muestra la CRA de los geles elaborados a partir de CP de calamar gigante a diferentes concentraciones de NaCl (1, 2 y 3%) y pH's (6.0, 6.5, 7.0). Los geles elaborados con 2% de NaCl muestran la mayor CRA, también esta propiedad es afectada por el pH, ya que tiene una tendencia a incrementar con el incremento de pH, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). Como puede observarse, los resultados de CRA coinciden con la gelificación, ya que los geles más débiles presentan menor CRA.

La estructura del gel influencia la habilidad del gel de retener agua, de tal forma que en un gel ordenado, el movimiento del agua puede encontrarse restringido comparado con una estructura menos ordenada (Ingadottir y Kristinsson, 2010). En un estudio realizado sobre las propiedades gelificantes de la miosina en carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) se encontró que la CRA incrementa significativamente de 45.7% a 73.1% conforme el pH incrementa de 5.5 a 8.0 (Liu y col., 2010).



**Figura 6.** Capacidad de retención de agua de los geles obtenidos de concentrados proteicos de calamar gigante a sus respectivos tratamientos.

En proteínas desnaturalizadas los grupos  $-\text{CO}$  y  $-\text{NH}$  se convierten en centros de polarización positivos y negativos en las cadenas polipeptídicas, estos centros pueden formar sistemas de agua multicapa, que finalmente debido al enfriamiento, los enlaces de hidrogeno contribuyen a atrapar el agua en la estructura (Damodaran, 2000). Lo anterior puede ser relacionado con el presente estudio, debido al incremento en CRA debido al rango de pH utilizado. Por lo que la variación en el CRA se atribuye a los cambios en la estructura de la proteína por acción del pH.

Cortés-Ruíz y col. (2008), detectaron un incremento en la CRA en geles de concentrados proteicos neutros ( $81.5 \pm 10.6\%$ ), respecto a elaborados a partir de manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) ( $64.6 \pm 6.4\%$ ), lo anterior atribuido al incremento de la concentración de proteínas solubles a  $I=0.5$  como resultado de los ciclos de lavado, además encontraron que los cambios de pH afectan la CRA probablemente resultado del efecto combinado de la agregación proteica, ya que se obtuvo una mayor CRA en los concentrados proteicos ácidos ( $95.3 \pm 2.0\%$ ).

Respecto a lo anteriormente expuesto, además del método de extracción, concentración de sal y pH, otro factor que puede influir en la determinación de CRA es el método empleado para la determinación (Sánchez-González y col. 2008). Sin embargo, se debe considerar el organismo en cuestión en el presente estudio, ya que se conoce la existencia de variaciones, no solo por la concentración de proteína, también por el acomodo de las fibras musculares entre las especies marinas.

## Caracterización Microestructural

### Efecto sobre las Transiciones de Fase

La desnaturalización de una proteína es una transición de la estructura nativa, plegada a la estructura desnaturalizada, desplegada, que ocurre en un intervalo de temperatura de desnaturalización. Se define como temperatura propia de desnaturalización, a la temperatura a la que se desnaturaliza el 50% de la proteína (Foegeding, 1988). Esta transición implica un calor de desnaturalización que a menudo es un proceso irreversible. La temperatura de desnaturalización el calor de desnaturalización dependen del pH, de la fuerza iónica, y de la velocidad de calentamiento, así como del procesamiento previo que haya recibido la proteína (Roos, 2007).

La temperatura máxima ( $T_m$ ) y la energía térmica neta ( $\Delta H$ ) de la desnaturalización térmica de las proteínas encontradas en los soles de CP se muestran en la Tabla 3. Se detectaron 2 picos endotérmicos con  $T_m$  entre 39.16-45.42 y 59.64-71.93 °C, respectivamente, los cuales podrían corresponder a las transiciones de miosina y actina, respectivamente. Se ha reportado que las transiciones endotérmicas de la miosina y actina del músculo de calmar gigante (*Dosidicus gigas*), se presentan a 50 y 79°C, respectivamente (Ramírez-Olivas y col., 2004). Estas proteínas, son importantes para la gelificación inducida térmicamente y se desnaturalizan a diferentes temperaturas, lo que resulta en las características típicas de un gel. Por tanto, las variaciones encontradas en el presente experimento pueden relacionarse al efecto combinado del pH y concentración de sal, ya que estas variables pueden ocasionar desplazamientos en las temperaturas de desnaturalización y modificación de la altura y anchura de los picos obtenidos.

**Tabla 3.** Temperatura máxima ( $T_m$ ) y entalpía ( $\Delta H$ ) de termograma de CDB de soles de CP a sus respectivos tratamientos.

Tratamiento NaCl(%) / pH	Pico 1		Pico 2	
	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
1/6.0	$39.36 \pm 0.33^e$	$0.04 \pm 0.00^f$	$71.52 \pm 1.56^{a,b}$	$0.05 \pm 0.00^f$
1/6.5	$42.06 \pm 0.47^c$	$0.14 \pm 0.00^c$	$68.59 \pm 0.23^c$	$0.09 \pm 0.00^d$
1/7.0	$44.30 \pm 0.20^b$	$0.34 \pm 0.00^a$	$71.61 \pm 0.05^{a,b}$	$0.26 \pm 0.01^a$
2/6.0	$44.58 \pm 0.27^{a,b}$	$0.07 \pm 0.00^e$	$0.00 \pm 0.00^e$	$0.00 \pm 0.00^g$
2/6.5	$40.79 \pm 0.11^d$	$0.02 \pm 0.00^f$	$70.68 \pm 0.01^{a,b,c}$	$0.15 \pm 0.00^c$
2/7.0	$45.42 \pm 0.12^a$	$0.09 \pm 0.01^{d,e}$	$71.93 \pm 0.03^a$	$0.06 \pm 0.00^e$
3/6.0	$39.16 \pm 0.11^e$	$0.11 \pm 0.01^{c,d}$	$59.64 \pm 0.16^d$	$0.07 \pm 0.00^e$
3/6.5	$42.45 \pm 0.42^c$	$0.31 \pm 0.02^b$	$69.73 \pm 0.08^{b,c}$	$0.23 \pm 0.00^b$
3/7.0	$44.40 \pm 0.05^{a,b}$	$0.30 \pm 0.01^b$	$70.89 \pm 0.08^{a,b}$	$0.23 \pm 0.00^b$

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

Los valores presentados son promedio de dos determinaciones.

En el presente estudio, al evaluar el efecto del pH y la concentración de sal en el primer pico, el cual se asocia a la miosina, se aprecia que las temperaturas de desnaturalización son fuertemente dependientes del pH y la fuerza iónica. La  $T_m$  más alta se observó con el tratamiento de concentración de sal (%) / pH de 2/7.0, mientras que la  $T_m$  más baja se presentó con 3/6.0. Respecto a lo anterior, Lin y Park (1998), mencionan que la sal cambia las transiciones de desnaturalización a temperaturas más bajas y disminuye las entalpías del calor de desnaturalización. Esta sensibilidad a la fuerza iónica y su relación con el pH, se evidenció con los valores de la entalpia del primer pico, que fueron del orden de  $2$  a  $9 \times 10^{-2}$  J/g, con 2% de NaCl, demostrando que en este ambiente, se requirió de menor energía para cambiar la microestructura de la miosina, en cambio, presentó mayor estabilidad térmica con el tratamiento 1% NaCl / pH7 al necesitar 0.34 J/mol.

El segundo pico, que se asocia a la actina, presentó valores de la temperatura de desnaturalización entre 60 y 72 °C, y la mayor fue para el tratamiento 2% NaCl / pH7. Se sabe que la actina es más estable térmicamente que la miosina, característica que se mantiene en las condiciones a las que se expuso en este estudio, excepto con el tratamiento 2% NaCl / pH 6, al no detectarse una transición térmica. La  $T_m$  más baja se observó con el tratamiento 3% NaCl / pH6, lo cual puede ser debido al cambio conformacional ocurrido en la actina durante la gelificación térmica, ya que mediante IR-TF se observa una disminución cercana al 50 % en la intensidad de la banda característica de esta estructura. Los valores bajos de la energía de desnaturalización, del orden de 0.0 a 0.26 J/mol, indican que los tratamientos modificaron la estructura de la actina. Se observó que independientemente del valor de la fuerza iónica, el pH de 6.0 afectó la energía de desnaturalización de la actina, lo anterior debido a que este pH afectó mayormente la estructura nativa de la actina.

Se puede afirmar que el efecto de los tratamientos afectó la estructura nativa de las proteínas en distinto grado, siendo mayor para la miosina que para la actina. Esto se puede discutir considerando los resultados obtenidos en el estudio de Ramírez-Olivas y col., (2004) donde se menciona que la energía necesaria para el desdoblamiento de la estructura nativa de la miosina y de la actina de músculo fresco de calamar gigante, es de 0.58J/g y de 0.33 J/g, respectivamente. Para contrastar estos resultados con los obtenidos en el presente estudio, se eligió el efecto del tratamiento 1% NaCl/pH71% (Tabla 3), y se observó que la disminución de la energía necesaria para desnaturizar a la miosina del sol fue mayor, de 0.58 J/g a 0.34 J/g (0.24 J/g) que para la actina del sol, que fue de 0.33 J/g a 0.26 J/g (0.07 J/g). Este efecto se repite en los otros tratamientos.

Resultados similares son presentados por Taskaya y col. (2009) en CP de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), puesto que las proteínas recuperadas de la carpa se someten a algún grado de agregación (evento exotérmico) debido a la precipitación isoeléctrica, puede reducir la entalpia de eventos endotérmicos, es por ello que la entalpia neta parece acercarse a cero y los picos no son detectados, además las proteínas pueden ser desnaturizadas debida al pH (ácido/alcalino).

Por otra parte la menor temperatura de desnaturalización, así como la menor cantidad de energía necesaria para inducir un cambio conformacional en las proteínas del CP sugieren una disminución de interacciones electrostáticas con el medio acuoso, esto ayuda a explicar la débil interacción con moléculas de agua y la interacción proteína-proteína mediante interacciones hidrofóbicas en la transición sol-gel. También explica la baja CRA reportada en los geles del concentrado proteico. Además las propiedades mecánicas y viscoelásticas corresponden a la calidad de los geles y son consistentes con los resultados de CDB.

## Caracterización Molecular

### Efecto sobre la Estructura Secundaria

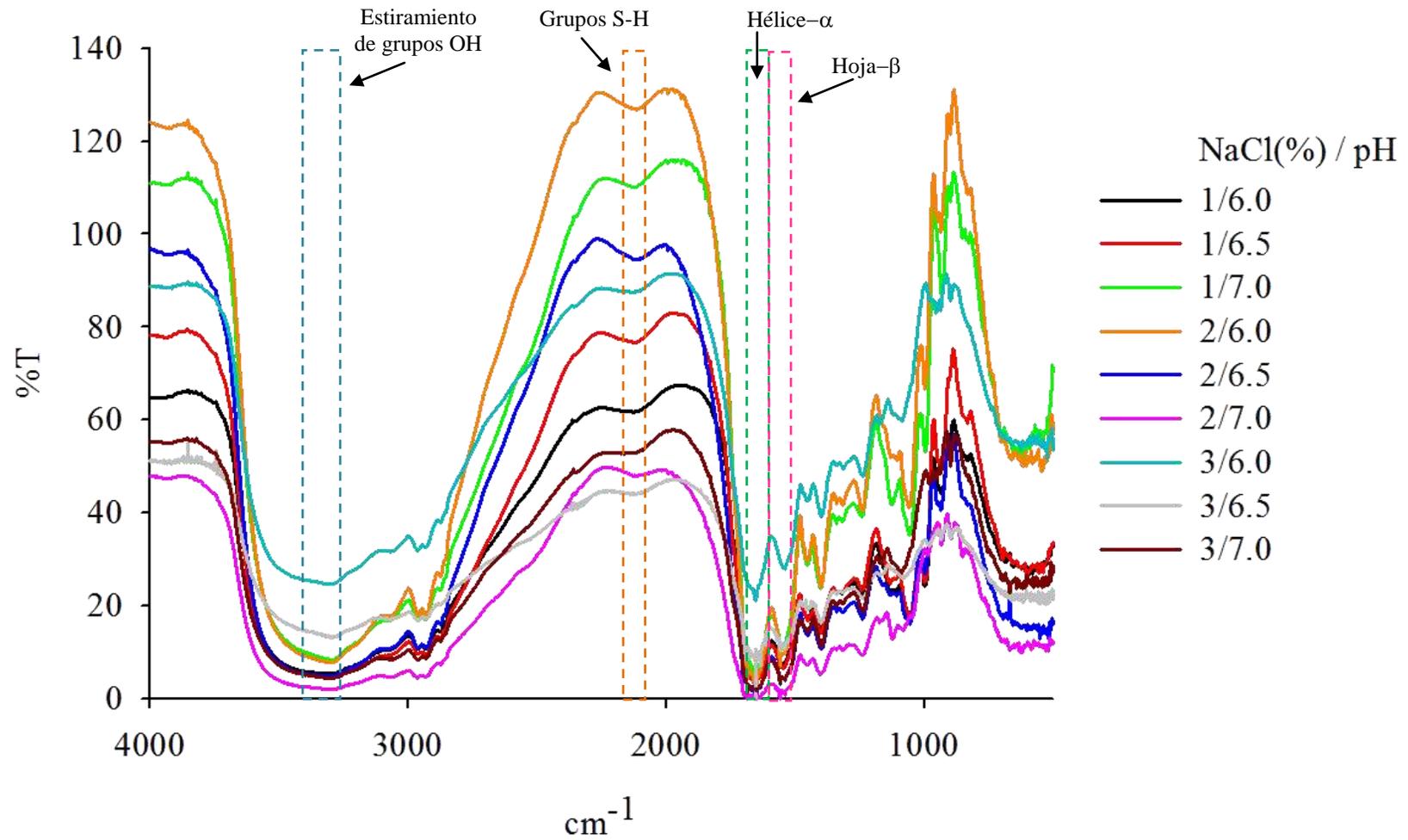
El contenido de los tipos de conformaciones que determinan la estructura secundaria puede ser estimado por la altura del pico a  $1658-1654\text{ cm}^{-1}$  para el hélice- $\alpha$  y  $1642-1624\text{ cm}^{-1}$  para la hoja- $\beta$  (Kong y Yu, 2007). Los estudios de IR en los soles y geles se muestran en las Figuras 7 y 8. En general, cada uno de los espectros de IR presentan una banda ancha entre  $3314-3294$  y  $3298-3281\text{ cm}^{-1}$ , tanto en soles como en geles, lo cual puede ser atribuido al estiramiento de los grupos OH o también a la contaminación por agua, ya que el proceso de liofilización aplicado hace a la muestra más susceptible a la absorción de agua del ambiente durante su manipulación, pese a las precauciones tomadas.

Durante la transición sol-gel se detectó que tanto la concentración de NaCl como la variación de pH influyen sobre el espectro de IR (Figura 7 y 8). Induciendo, dependiendo del pH y la concentración de sal empleados variaciones en la intensidad de las bandas relacionadas a la formación de enlaces S-S durante la transición sol-gel. Se ha reportado que bajo ciertas condiciones químicas puede o no inducir la formación de enlaces tiol, la cual influye en las características reológicas que presentan los geles formados, como su viscoelasticidad. Siendo un factor determinante el pH, ya que Tolano-Villaverde (2010), al trabajar bajo condiciones alcalinas, establece la nula formación de enlaces disulfuro, al no apreciar cambios en las bandas S-H y S-S, reportando geles con menor viscoelasticidad en comparación con el control empleado.

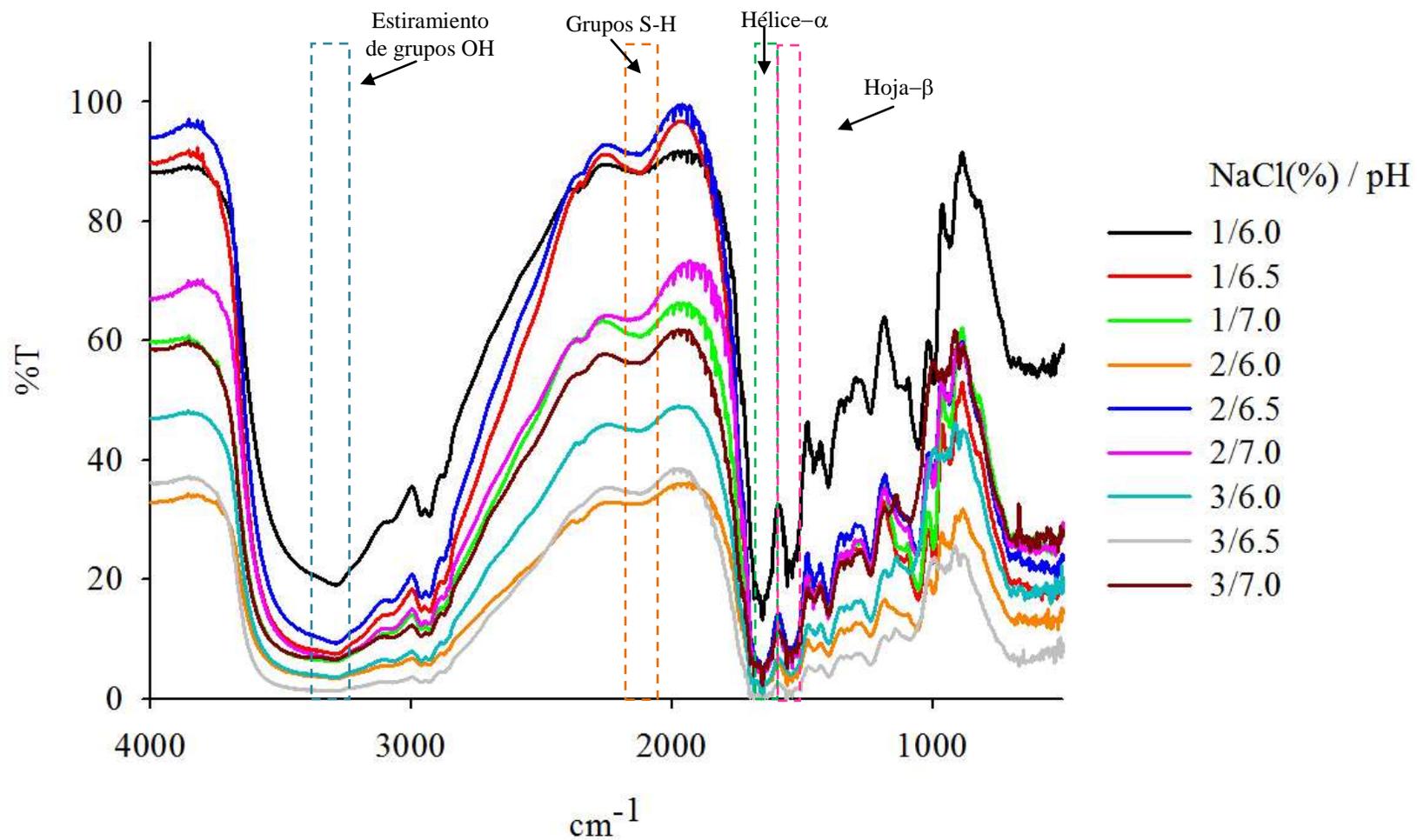
Por otra parte, según Venugopal (1997), la gelificación implica la agregación de las porciones cabeza y cola por interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro. Entonces durante la formación del gel, ocurre una reacción entre los grupos tiol para producir enlaces disulfuro, por consiguiente es de esperar la disminución del contenido de SHT al formarse el gel, tal como se mostrará a continuación en la determinación del contenido de SHT (Figura 9) de soles y geles de CP.

Como es conocido, cada fracción de estructura secundaria depende, entre otras cosas, de la secuencia linear de aminoácidos de la miosina (estructura primaria), pH y Temperatura. Por consiguiente, los cambios estructurales de las proteínas durante la formación del gel deben permitir la formación de la red tridimensional que de soporte al gel formado. Lo cual puede ser establecido mediante el seguimiento de ciertas bandas, como la banda característica de la estructura de hélice- $\alpha$ , donde se apreció un incremento de su intensidad durante la transición sol gel. En cuanto al efecto del pH y la concentración de la sal, se detectó que estos dos factores influyeron en la intensidad de la banda relacionada a hélice- $\alpha$ . Cabe mencionar que la intensidad de la banda característica de éste tipo de estructura incrementa con el incremento de pH a una misma concentración de sal, excepto al 3% de NaCl, lo cual puede ser relacionado con su hidrofobicidad de superficie, ya que como se mostrará a continuación, los soles presentaron mayor hidrofobicidad independientemente del pH a una concentración del 3% de NaCl (Figura 11).

Lo anterior puede ser debido a cambios en la conformación de la proteína debido a la desnaturalización química, ya que en condiciones de altas concentraciones de sal ( $>0.3$  M NaCl) y altos pH ( $>7$ ) se presenta la disociación de la miosina (Weeds y Pope, 1977).



**Figura 7.** Espectro de IR de soles de concentrados proteicos de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) a sus respectivos tratamientos.



**Figura 8.** Espectro de IR de geles de concentrados proteicos de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) a sus respectivos tratamientos.

Thawornchinsombut y Park (2007), observaron que el surimi convencional presenta el menor valor de superficie hidrofóbica, pese a que el contenido de sal es comparable al utilizado con concentrados proteicos ácidos o alcalinos, asimismo notaron que un incremento en la concentración de sal de 10 a 150 mM en los CP ácido/alcalino incrementa el desdoblamiento proteico.

La banda característica de la estructura de hélice- $\alpha$ , presenta mayor intensidad en los geles que en los soles, lo cual demuestra que la transición sol-gel en proteínas de manto de calamar favorece la formación de regiones  $\alpha$ -hélice. Jang y col. (2011), al estudiar el pH en conjunto con la temperatura durante la transición sol-gel de soluciones acuosas de poli(etilenglicol)-poli(alanina) injertado con quitosano, establecieron que conforme se incrementa la temperatura incrementa la intensidad del pico relacionado con la conformación de hélice- $\alpha$  de este compuesto. Por lo que, los cambios conformacionales detectados en este trabajo pudieran ser resultado del efecto del pH y NaCl, a su vez por el tratamiento térmico que se aplica a los CP para la formación del gel, lo cual sugiere el desplegamiento de la proteína.

Se ha reportado que la estructura de  $\alpha$ -hélice decrece con un incremento concomitante del contenido de estructuras agregadas, como la hoja- $\beta$ , debido a la alta concentración de sal (Persic y col., 2011). En este estudio, al comparar la intensidad de las bandas se visualiza que la correspondiente al tipo de conformación de hoja- $\beta$  presenta mayor intensidad que la correspondiente hélice- $\alpha$ . Asimismo, la intensidad de la banda característica a la hoja- $\beta$  ( $1537\text{ cm}^{-1}$ ) tiende a incrementar con el incremento de pH durante la transición sol-gel, excepto al 3% de NaCl, en cambio por efecto de la concentración de sal en el contenido de hoja- $\beta$  tiende a disminuir excepto al 2 y 3% de NaCl a pH de 6.5.

Al evaluar el efecto del pH y la concentración de sal en los espectros de IR-TF (Figura 7) de los soles, se apreció un efecto combinado de estas variables. Al estudiar el efecto de pH en el contenido de SH en soles se observa que la disminución en la intensidad de esta banda responde al incremento de pH, salvo al 1% de NaCl. Respecto al efecto de la concentración de sal en soles, se tiene que a al 2% de NaCl se presenta mayor intensidad a pH de 6.0 y 6.5 para la banda propia de enlaces S-H.

En cuanto a la banda relacionada con la estructura de hélice- $\alpha$  en soles (Figura 7), solo el tratamiento en el cual se trabajó a pH a de 6.0 y 3% de NaCl se apreció un efecto marcado en esta banda. Este comportamiento puede ser atribuido al desdoblamiento de la miosina (Weeds y Pope, 1977). El desdoblamiento ocurrido en la miosina, inducirá la exposición de aminoácidos hidrofóbicos, modificando así la hidrofobicidad del sol, tal como se apreció en este trabajo, ya que dicho tratamiento es el que presenta mayor hidrofobicidad (Figura 11), como se comentara más adelante. Lo anterior es contrario a lo observado por Thawornchinsombut y Park (2007), quienes a pesar de detectar mayor desdoblamiento en la proteína no detectaron cambios en la hidrofobicidad del surimi obtenido.

Aunque se evaluó de forma conjunta el efecto del pH y la concentración de sal, es notorio el efecto del pH contenido de hoja- $\beta$  en soles (Figura 7), a concentración de 3% de NaCl, ya que a esta concentración de sal, la intensidad de la banda disminuye con el incremento de pH. En contraparte, a pH de 6.0 se aprecia la disminución de la intensidad al incrementar la concentración de NaCl.

Al analizar los espectros de IR-TF los geles (Figura 8) para el enlace S-H, se apreció que al igual que en los soles, hubo un efecto combinado del pH y el % de sal, no obstante el patrón observado es diferente, como se mencionó anteriormente atribuido a la transición sol-gel. Al

trabajar al 2% de NaCl y pH 6.0, se detectó la menor intensidad de la banda relacionada con el enlace S-H, mientras que, al trabajar a pH de 6.5 y esta misma concentración de sal se presenta la mayor intensidad para la banda característica de esta estructura.

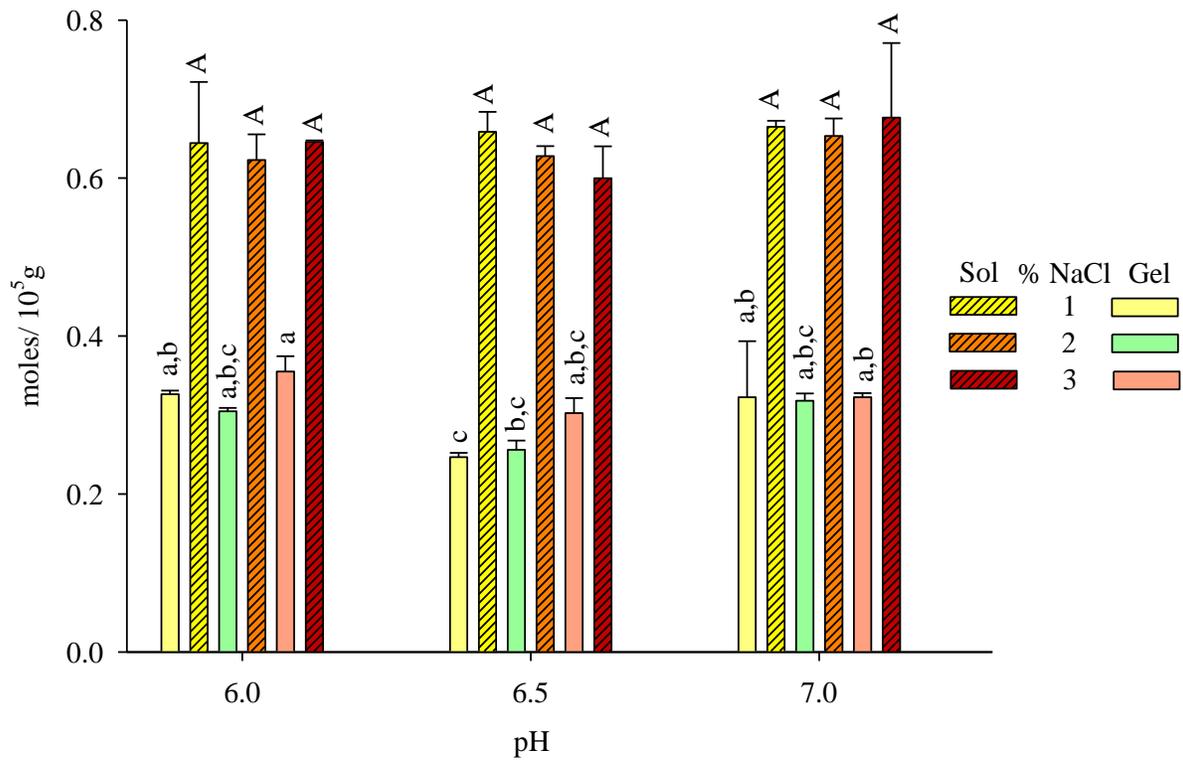
En relación al contenido de hélice- $\alpha$  en geles (Figura 8), la banda característica de esta estructura presenta mayor intensidad a una concentración del 1% de NaCl y pH de 6.0, mientras que al 3% de NaCl y pH de 6.5 tiene la menor intensidad. Persic y col. (2011), al evaluar el tipo y concentración de sal en la estructura proteica y propiedades de hidratación en la carne de bovino (*Lonsissimuss dorsi*), apreciaron que a altas concentraciones de sal se manifiesta una banda a  $\sim 1631\text{ cm}^{-1}$  y una pequeña banda cerca de  $1693\text{ cm}^{-1}$ , las cuales fueron asignadas a estructura de hoja- $\beta$  agregada, estableciendo que al incrementar la concentración de sal en el medio se da una mayor agregación de las proteínas, relacionando este fenómeno con una disminución en la banda relacionada a la estructura de hélice- $\alpha$  en las proteínas miofibrilares estudiadas. Por lo que el decremento en la región de la hélice- $\alpha$  observado en este estudio, sugiere la agregación de las proteínas miofibrilares, así como la apertura excesiva de la molécula, induciendo geles con reducida CRA como anteriormente se menciona (Figura 6). Esto en base a lo observado en el comportamiento de la banda relacionada a la estructura de hoja- $\beta$  y la formación de puentes disulfuro.

### **Efecto sobre el Contenido de Sulfhidrilos Totales (SHT)**

Los residuos –SH hidrofóbicos se exponen durante el tratamiento térmico para la formación de gel, durante este proceso se puede dar lugar a reacciones de intercambio –SH o S-S o interacciones hidrofóbicas. Durante la formación de un gel proteico duro y turbio es importante que estos residuos activos se encuentren presentes en un lugar accesible de la molécula.

Los resultados obtenidos en la cuantificación SHT en los soles y geles de CP se muestran en la Figura 9. No se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos respecto al contenido de SHT en los soles, lo cual es de esperarse, ya que es el mismo sistema proteico utilizado en la preparación de todos los soles. Sin embargo, se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) en SHT de geles, lo cual pudiera atribuirse al efecto del pH y la concentración de sal empleada en la gelificación.

Se detectó una disminución de SHT en la transición sol-gel. Dicha disminución se puede atribuir a la formación de enlaces S-S a través de la oxidación de grupos SH (Lanier, 2000). Lo cual se relaciona con la intensidad de la bandas en el espectro de infrarrojo (Figura 7 y 8) durante la transición sol-gel. Un comportamiento similar ya ha sido reportado por Ingadottir y Kristinsson (2010), quienes al comparar el contenido de SHT de las pastas de proteína antes y después de la cocción, encontraron que el músculo lavado con agua exhibe el mayor contenido de SHT antes de la cocción, mientras que el músculo lavado con solución salina presentó un contenido de SHT significativamente menor.



**Figura 9.** Contenido de SHT en soles y geles de concentrados proteicos de calamar gigante a diferentes % NaCl (1, 2, 3) y pH (6.0, 6.5, 7.0).

Letras diferentes en barras del mismo grupo (sol o gel) indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

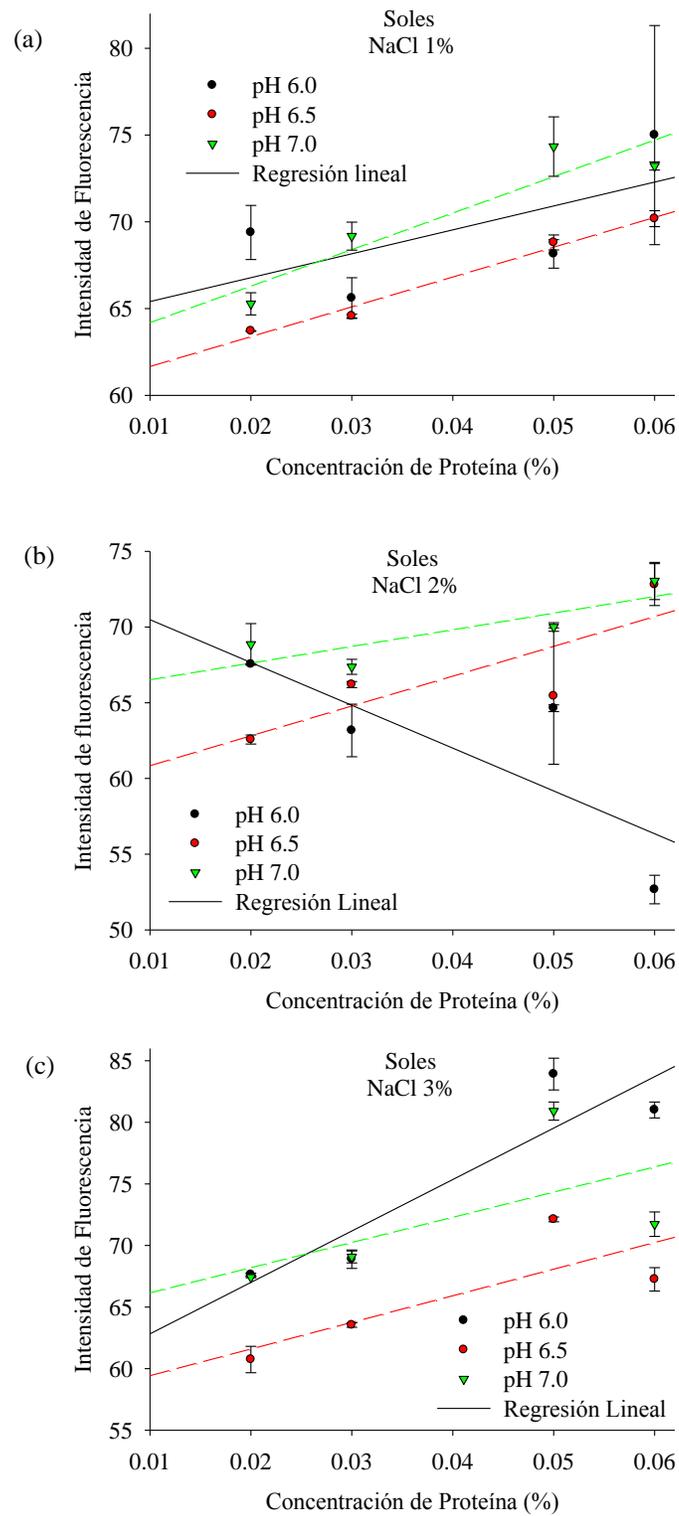
### **Efecto sobre la Hidrofobicidad de la Superficie**

Los resultados de hidrofobicidad de superficie obtenidos en soles y geles de CP se muestran en las Figuras 10 y 11, respectivamente.

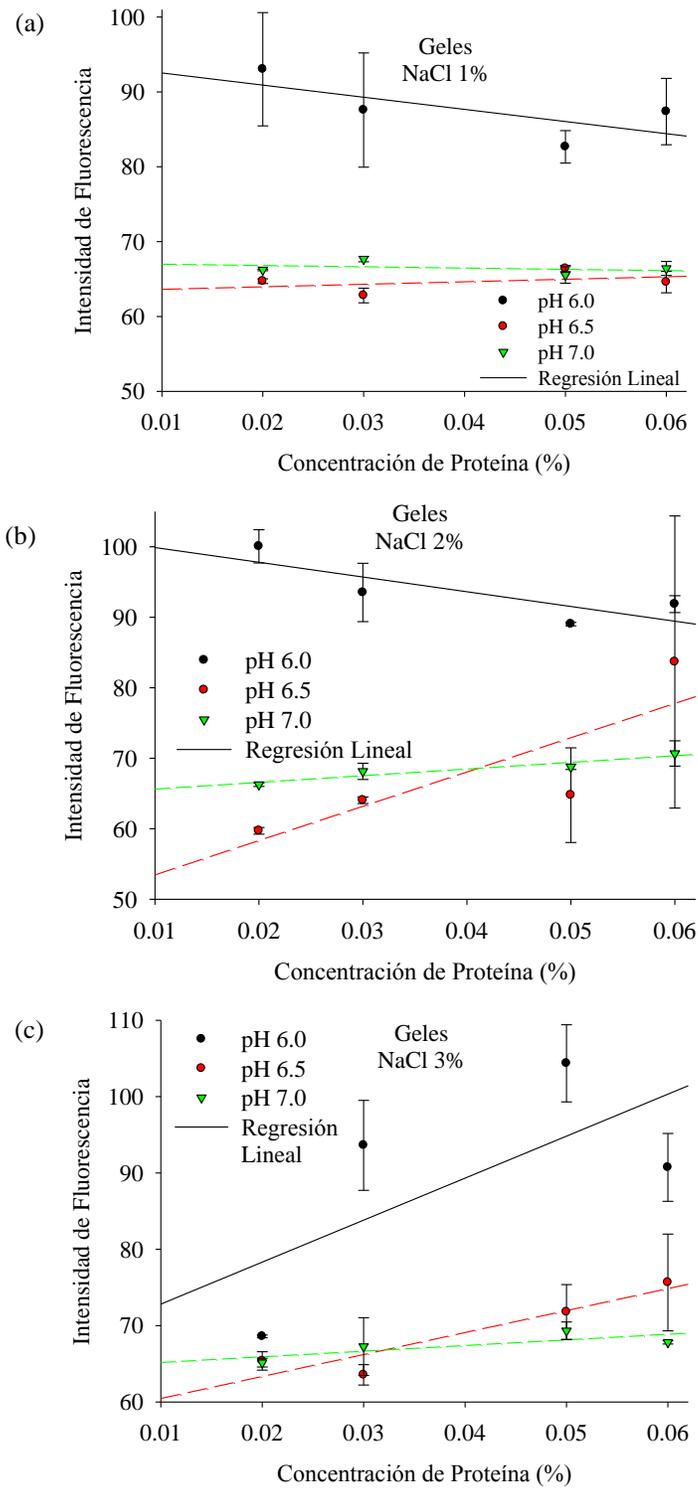
En la Figura 10 (a), se observa que los soles a los cuales se adiciono 1% de NaCl presentan un carácter más hidrofóbico al incrementar el pH, inverso a lo que se presenta en los soles que contienen 3% de NaCl, Figura 10 (c). Como se puede ver los soles elaborados al 2% NaCl, Figura 10 (b), muestran diferente un comportamiento ya que la intensidad de la fluorescencia disminuye al incrementar el pH, excepto a pH 6.0. El incremento anterior incremento en la hidrofobicidad es probablemente conferido a cambios en la estructura de la región de la cabeza de la miosina, la cual es soluble en soluciones salinas de baja y alta fuerza iónica. Al desnaturalizarse la miosina, es probable que exponga grupos hidrofóbicos que previamente se encontraban en el interior de la estructura de la proteína. Por otra parte, la pendiente negativa encontrada en soles obtenidos a pH de 6.0 y 2% de NaCl, probablemente en estas condiciones se encuentren escasas regiones hidrofóbicas a las cuales puede unirse el ANS y emitir fluorescencia.

En la Figura 11 (a), se muestra el efecto de la concentración de 1% NaCl, en la cual se observa que sólo a pH de 6.5 se obtiene una pendiente positiva, la cual responde al incremento en la superficie hidrofóbica respecto el incremento de la concentración de proteína. Ahora bien, en la Figura 11 (b), se distingue una pendiente negativa a pH de 6.0 al emplear 2% de NaCl, mientras que a pH de 6.5 se tiene mayor carácter hidrofóbico que a pH de 7.0.

Típicamente, la carga total de la proteína se puede ver afectada por los tratamientos ácidos, mientras que la interacción entre las superficies cargadas de las proteínas podrían ser afectadas debido al efecto de blindaje (Dill, 1990).



**Figura 10.** Efecto de la concentración de NaCl (1, 2 y 3%) y pH (6.0, 6.5 y 7.0) sobre la hidrofobicidad de superficie de soles de CP de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*).



**Figura 11.** Efecto de la concentración de NaCl (1, 2 y 3%) y pH (6.0, 6.5 y 7.0) sobre la hidrofobicidad de superficie de geles de CP de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*).

Posteriormente, en la Figura 10 (c), se observa que al adicionar 3% de NaCl en los geles se reduce la hidrofobicidad de superficie con el incremento de pH, asimismo, a esta concentración de sal se presenta mayor hidrofobicidad. Como ya se mencionó, al desnaturalizarse la miosina puede exponer grupos hidrofóbicos que se encontraban en el interior de la estructura proteica. Por consiguiente, la adición de la sal probablemente interrumpa interacciones electrostáticas entre el ANS y la proteína, reduciendo entonces la fuerza del enlace hidrofóbico entre estos.

Durante la transición sol-gel, en general, ocurre una disminución en la superficie hidrofóbica, salvo al 2% de NaCl y pH de 6.5, así como al 3% de NaCl a pH de 6.0 y 6.5. Esto pudiera deberse a cambios conformacionales que experimentan las proteínas como resultado del proceso térmico, tal como se corrobora en el análisis de los espectros de IR-TF (Figura 7 y 8).

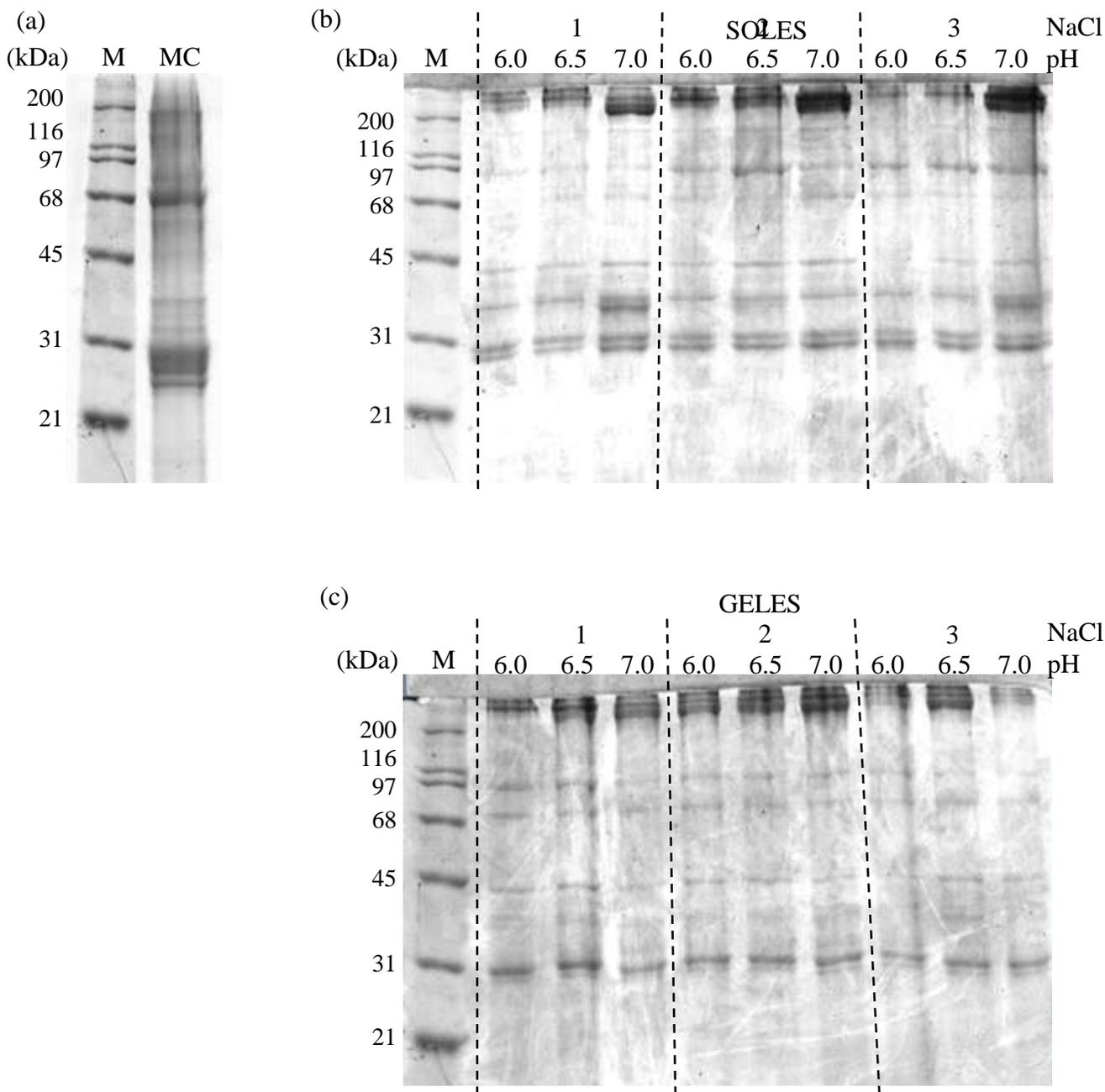
### **Efecto sobre el Peso Molecular**

En las Figuras 12 y 13, se ilustra el perfil electroforético sin o con  $\beta$ -mercaptoetanol de proteínas del MC, así como soles y geles de CP a sus respectivos tratamientos. La Figura 12 (a), muestra las proteínas musculares extraídas del manto de calamar (MC), en la cual se observan 8 bandas, que en función del peso molecular se asocian a la cadena pesada de miosina (CPM  $\approx$  200 kDa), actina (AC  $\approx$  45) y la cadena ligera de miosina (CLM= 16-22 kDa). Como se puede observar en la Figura 12 (b), durante el estado de sol se presentan cambios de importancia en el perfil electroforético respecto al MC, puesto que durante los ciclos de lavado parte de las proteínas sarcoplásmicas son eliminadas, concentrando así, las proteínas miofibrilares. Por encima de 200 kDa se observa la presencia de tres bandas contiguas, las cuales probablemente corresponden a la hidrólisis de la CPM, debido a que las

condiciones empleadas (%NaCl/pH) en la elaboración de soles, pueden haber activado enzimas proteolíticas remanentes, las cuales pudieron haber degradado las moléculas de miosina en fragmentos más cortos. Lo anterior ya ha sido documentado por Konno y col (2003), así como por Ramírez-Olivas y col (2004), quienes han reportado una alta actividad proteolítica endógena del manto de calamar. Cerca de los 150 kDa se observa una banda que posiblemente represente la meromiosina pesada (MMP), también es posible observar la presencia de paramiosina y actina, alrededor de los 97 y 45 kDa, respectivamente. Se observan además proteínas de bajo peso molecular, que fueron solubilizadas independientemente de la concentración de sal. Dichas proteínas, también han sido reportadas por Thawornchinsombut y Park (2005) en las proteínas extraídas a pH neutro de merluza del pacífico (*Merluccius productus*). Se ha reportado que las bandas de bajo peso molecular observadas en el extracto del músculo, son resultado de la hidrólisis de la miosina inducido por la activación de enzimas (Kelleher y Hultin, 2000).

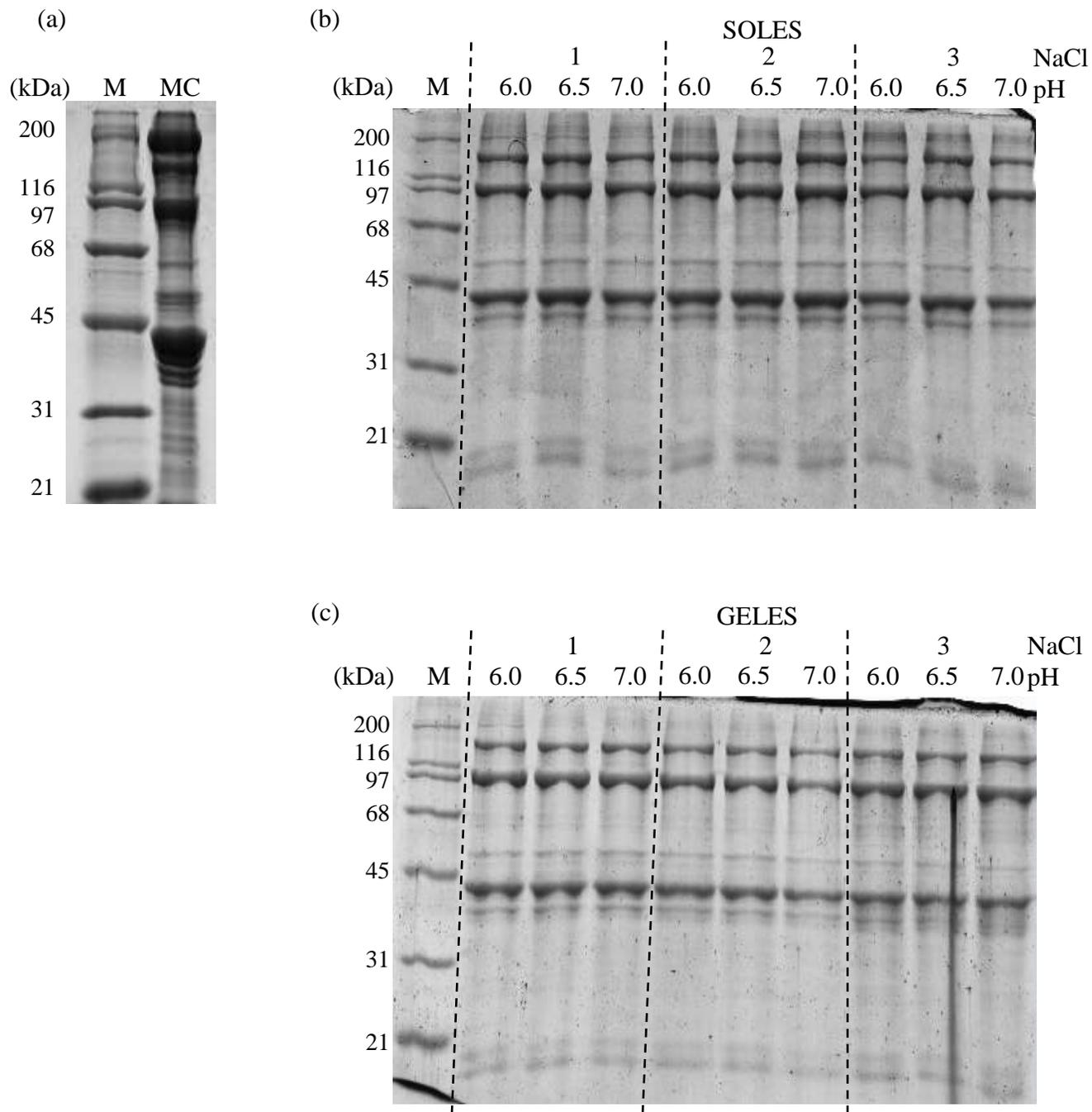
En general, es posible observar de forma conjunta el efecto del pH y la concentración de sal en las proteínas encontradas en soles de CP, más sin embargo, es notorio que independientemente de la concentración de sal a pH de 7.0 se presentan mayor intensidad en las bandas, lo cual hace inferir sobre algún efecto de esta variable en la conformación proteica. Lo antepuesto, debido a que en términos de estabilidad térmica (Tabla 3), los CP elaborados a pH 7.0 tienen mayor entalpía de desnaturalización.

En el concentrado proteico se destaca la presencia de miosina. Ésta molécula contiene seis cadenas polipeptídicas, que incluyen dos cadenas pesadas idénticas de 220 kDa. Las cadenas



**Figura 12.** Perfil electroforético (SDS-PAGE) de proteínas del MC (a), así como soles (b) y geles (c) de CP a sus respectivos tratamientos.

NaCl/pH corresponde a la concentración (%) de NaCl y pH empleados al elaborar los CP de los soles y geles, M, marcador estándar de proteínas.



**Figura 13.** Perfil electroforético (SDS-PAGE reductor) de proteínas del MC (a), así como soles (b) y geles (c) de CP a sus respectivos tratamientos.

NaCl/pH corresponde a la concentración (%) de NaCl y pH empleados al elaborar los CP de los soles y geles, M, marcador estándar de proteínas.

pesadas de la miosina tienen regiones de “cabeza” y “cola” que reflejan las porciones globular y bastón, respectivamente, de las moléculas. La estructura secundaria principal de la cabeza es una hélice- $\alpha$  (Kijowski, 2001). Durante la transición sol-gel, como ya se mencionó anteriormente, deben ocurrir cambios en la estructura que permitan la formación de la red que de soporte al gel formado por el tratamiento térmico aplicado. En este sentido, la Figura 12 (c) muestra la desaparición de la banda de MMP, asimismo se observa que actina y miosina disminuyen su intensidad, aunado a la desaparición de bandas de bajo peso molecular, lo cual pudiera deberse a la formación de agregados proteicos. Rawdkuen y col. (2009), observaron la disminución de la banda de tropomiosina (TM) y el incremento de la banda que corresponde a la actina (AC) en el proceso alcalino, reportando que la reducción de estas bandas fueron inducidas por la hidrólisis acida/alcalina durante la solubilización.

En la Figura 13 se muestra el perfil electroforético de proteínas del MC, así como soles y geles de CP a sus respectivos tratamientos en condiciones reductoras. En general, aparecen mayor cantidad de bandas en condiciones reductoras, debido al rol del  $\beta$ -mercaptoetanol, el cual rompe enlaces S-S, lo que da lugar a la fraccionación en subunidades de la proteínas presentes en condiciones nativas. Como se muestra en la Figura 13 (a), las proteínas musculares del MC comprenden pesos moleculares de 26-220 kDa, nuevamente destaca la presencia de la cadena pesada de miosina (CPM), actina y la cadena ligera de miosina (CLM), así como otras proteínas propias de la miofibrilla, como probablemente  $\beta$ -actina (31-35 kDa), tropomiosina (33-36 kDa) y cadena ligera alcalina de miosina (CLM) (16-22 kDa).

Al comparar los perfiles electroforéticos de soles y geles obtenidos en condiciones reductoras, Figura 13 (b) y (c), es posible observar la desaparición de la banda de 200 kDa encontrada en el SDS-PAGE, por lo cual es de esperarse encontrar bandas inferiores como se muestran en los

perfiles electroforéticos, debido al rompimiento de enlaces S-S por las condiciones reductoras empleadas. Por otra parte, se aprecia de forma cualitativa el incremento en intensidad de la banda cercana a los 40 kDa, respecto al SDS-page. Lo anterior, hace suponer que la red tridimensional formada en los geles podría ser estabilizada por enlaces S-S.

## CONCLUSIONES

La aplicación de un ciclo de lavado para la recuperación de proteínas miofibrilares del músculo de calamar gigante, resultó con un rendimiento mayor que los métodos de extracción alcali/ácida, además, el aumento de la fuerza iónica a pH's por encima de su punto isoeléctrico al elaborar el sol, mejoraron sus propiedades de gelificación, aunque en diferente grado que dependió del tratamiento.

De acuerdo al análisis de perfil de textura, con 1% de NaCl y pH 6.0, se obtuvo un gel de mayor calidad, es decir, más duro, más elástico, con más adhesividad y cohesividad que los obtenidos con los otros tratamientos, además, no presentó fractura. El comportamiento reológico de estos soles observado en el reómetro fue intermedio entre una estructura fluida y una rígida., Sin embargo, estos geles presentaron, la menor capacidad de retener agua, que se pudo explicar por el desarrollo de una estructura que no permite una interacción apropiada entre el agua y la proteína durante la transición sol gel, como lo es la hoja- $\beta$ .

La modificación del proceso de obtención del concentrado proteico, el ajuste de pH por encima del punto isoeléctrico y el incremento de la fuerza iónica, repercutieron en los cambios de conformación y estructura durante la gelificación, que se observaron por la disminución de la estabilidad térmica, de la hidrofobicidad de superficie y del contenido de SHT de la miosina y actina recuperadas, así como, con el incremento de la intensidad de la banda relacionada a la estructura de hélice- $\alpha$  durante la transición sol-gel.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar de forma independiente el efecto del pH y la concentración de NaCl, para establecer con ello la forma en que estas dos variables repercuten en los cambios de estructura y conformación de los soles y geles de CP, así como en la calidad del gel obtenido.

Para facilitar la comprensión de los cambios en la hidrofobicidad de superficie de los soles y geles de CP, puede ser sugerido el empleo de PRODAN, ya que éste al ser es un compuesto sin carga y sensible al solvente, elimina las posibles contribuciones de las interacciones electrostáticas que el ANS confiere a esta determinación.

Además del empleo de FT-IR para elucidar cambios en la estructura secundaria, se propone el empleo de dicroísmo circular para complementar la información obtenida de los espectros, ya que es una técnica más sensible a los cambios en la estructura proteica y la conformación.

Finalmente sería recomendable el empleo de polímeros naturales a base de carbohidratos que permitan una mejora en la CRA de los geles obtenidos.

## REFERENCIAS

- Alizadeh-Pasdar, N. y Li-Chan, E. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 328-334.
- Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. (2011). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*. Mazatlán, Sinaloa. Recuperado en: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca).
- Añón, M.C. y Jovanovich, G. (2000). Calorimetría diferencial de barrido. En A.M.R. Pilosof y G.B. Bartholomai (Eds.), *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (pp. 97-123). Argentina: Ed. Universitaria de Buenos Aires.
- Ako, K., Nicolai, T. y Durand, D. (2010). Salt-induced gelation of globular protein aggregates: structure and kinetics. *Biomacromolecules*, 11, 864-871.
- Alvarez, P.A., Ramaswamy, H.S. y Ismail A.A. (2008). High pressure gelation of soy proteins: effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering* . 88, 331-340.
- Beltrán L.A.I. (2000). Evaluación y comparación de la calidad reológica de surimis de cinco especies potencialmente aprovechables del Golfo de California. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Instituto Politécnico Nacional.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Ishizaki, S., y Tanaka, M. (2001). Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Journal of Food Science*, 66, 1311-1318.
- Bertram, H.A. Kohler, A. Böcker, U. Ofstad, R. y Andersen, H.J. (2006). Heat-Induced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities. A combined FT-IR spectroscopy and Low-Field NMR relaxometry study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1740-1746.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62-66.
- Cifuentes, L., Torres, G. y Frías, M. (1997). *El océano y sus recursos. II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química*. Recuperado en: <http://www.bionica.info/biblioteca/Cifuentes1997b.pdf>
- Cortés-Ruiz, J. Pacheco-Aguilar, R. Lugo-Sánchez, M. Carvallo-Ruiz, G. y García-Sánchez, G. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Food Chemistry*, 110, 486-492.

- Choi, Y.L. y Park, J.W. (2002). Acid-aided protein recovery from enzyme-rich Pacific whiting. *Journal of Food Science*, 68(8), 2962-2967.
- Damodaran S. 2000. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En O. Fennema (Ed). *Química de los alimentos*. (pp. 386-469). Zaragoza, España: Ed. Acribia.
- De la Cruz-González, F.J. Aragón-Noriega, E.A. Urciaga-García, J.I. Salinas-Zavala, C.A. Cisneros-Mata, M.A. y Beltrán-Morales, L.F. (2007). Análisis socioeconómico de las pesquerías de camarón y calamar gigante en el Noroeste de México. *Interciencia*, 32(3), 144-150.
- De La Fuente-Betancourt, G. García-Carreño, F. Navarrete Del Toro, M.A. y Córdova-Murueta, J.H. (2009). Effect of pH and temperature on jumbo squid proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 33, 260-272.
- Denavi, G.A. Pérez-Mateos, M. Añón, M.C. Montero, P. Mauri, A.N. Gómez-Guillén, M.C. (2009). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23, 2094-2101.
- Dihort-Garcia, G. Ocano-Higuera, V.M. Ezquerro-Brauer, J.M. Lugo-Sanchez, M.E. Pacheco-Aguilar, R. Barrales-Heredia, S.M. y Marquez-Rios E. (2012). Producción y evaluación funcional de un concentrado proteico a partir de manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) por medio de disolución alcalina y precipitación isoelectrica. *CyTA-Journal of Food*. 9, 171-179.
- Encinas J.J. (2011). Efecto de la fuerza iónica en la recuperación de proteínas del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y evaluación de sus propiedades funcionales. Tesis Licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad de Sonora.
- FAO. (2010). *Yearbook of Fishery Statistics*. Recuperado en: <ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/default.htm>.
- Félix-Armenta, A. Ramirez-Suarez, J.C. Pacheco-Aguilar, R. Díaz-Cinco, M.E. Cumplido-Barbeitia, G. y Carvalho-Ruiz, G. (2009). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle gelled-emulsified type product: Formulation, processing and physicochemical characteristics. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1517-1524.
- Flores, J. y Bermell, S. (1986). Capacidad de gelificación de las proteínas miofibrilares. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 26(3), 318-324.
- Foegeding, E.A. (1988). Thermally induced changes in muscle proteins. *Food Technol*, 42, 58-64.
- Gómez-Guillén, M.C. y Montero, P. (1997). Improvement of giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle gelation by using gelling ingredients. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 204, 379-384.

- Gómez-Guillén, M.C. Montero, P. Solas, M.T. y Borderías, A. J. (1998). Thermally induced aggregation of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle proteins. Physicochemical contribution of added ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3440-3446.
- Hashimoto, K. Watabe, S. y Kono M. (1979). Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 4(11), 1435-1441
- Haskard, C.A. y Li-Chan E.C.Y. (1998). Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2671-2677.
- Hofmann, K. Hamm, R. (1978). Sulfhydryl and disulfide groups in meats. *Advances in Food Research*, 24, 1-111.
- Honikel, K.O. (2009). Moisture and Water-Holding Capacity. En L.M.L. Nollet y F. Toldrá (Eds). *Handbook of muscle food analysis*. (pp. 323-324). Boca Raton: Ed. Taylor & Francis Group, LLC
- Hsu, K.C. Hwang, J.S. Yu. C.C. y Jao, C.L. (2007). Changes in conformation and in sulfhydryl groups of actomyosin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) on hydrostatic pressure treatment. *Food Chemistry*, 103, 560-564.
- Ingadottir, B. y Kristinsson, H.G. (2010). Gelation of protein isolates extracted from tilapia light muscle by pH shift processing. *Food Chemistry*, 118, 789-798.
- Jang, J.H. Choi, Y.M. Choi, Y.Y. Joo, M.K. Park, M.H. Choi, B.G. Kang, E.Y. y Jeong, B. (2011). pH/temperature sensitive chitosan-g-(PA-PEG) aqueous solutions as new thermogelling systems. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 5484-5491.
- Jiang, S. Ho, M. y Lee, T.C. (1985). Optimization of the freezing conditions on mackerel and amberfish for manufacturing minced fish. *Journal of Food Science*, 50, 727-732.
- Kaletunç. G. (2009). Calorimetric methods as applied to food: an overview. En G. Kaletunç (Ed.). *Calorimetry in Food Processing*. (pp. 5-14). Iowa, E.U.A: Willey-Blackwell and Institute of Food Technologist.
- Kang, E.J. Hunt, A.L. y Park, J.W. (2008). Effects of salinity on physicochemical properties of Alaska pollock surimi after repeated freeze-thaw cycles. *Journal of Food Science*, 73(5), C347-C355.
- Kato, A. y Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 13-20.

- Kelleher, S.D. y Hultin, H.O. (2000). Functional chicken muscle protein isolates prepared using low ionic strength, acid solubilization/precipitation. *Reciprocal Meat Conference Proceeding*, 53, 76-81.
- Kijowski, J. (2001). Muscle proteins. En Z.E. Sikorski (Ed). *Chemical and functional properties of food proteins*. (pp 233–264). New York: CRC Press LLC.
- Kielley, W.W. y Bradley, L.B. (1956). The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 218, 653–659.
- Kim, Y.S. (2002). Physicochemical characteristics of fish myofibrillar and sarcoplasmic proteins treated at various pH conditions. Tesis Maestria. Oregon State University, Corvallis, OR.
- Kim, Y.S. y Park, J.W. 2008. Negative roles of salt in gelation properties of fish protein isolate. *Journal of Food Science*, 73(8), C585-C588.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of food proteins: A review. *CRC. Crit. Re. Nutrition & Food Science*, 7, 219-280.
- Kong, J. y Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559.
- Konno, K. Young-ie, C. Yoshida, T. Shinho, P. y Seki, N. (2003). Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Fisheries Science*, 69, 204-209.
- Krimm, S.y Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 308, 181–364.
- Kristinsson, H.G. y Hultin, H.O. 2003. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7187–7196.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lanier, T.C. (1992). Measurement of surimi composition and functional properties. En T.C. Lanier y C. Lee. *Surimi Technology*. (pp. 123-163). New York, NY: Marcel Dekker.
- Lanier, T.C. (2000). Surimi gelation chemistry. En J.W. Park (Ed). *Surimi and surimi seafood*. (pp. 237–265). New York: Marcel Dekker.
- Liu, R. Zhao, S.M. Liu, Y.M. Yang, H. Xiong, S.B. Xie, B.J. y Qin L.H. (2010). Effect of pH on the gel properties and secondary structure of fish myosin. *Food Chemistry*, 12, 196–202.

- Lluch, M.A. Pérez, M.I. y Hernando, I. (2001). Proteins in food structures. En Z.E. Sikorski (Ed). *Chemical and functional properties of food proteins*. (pp. 13-33). E.U.A.: Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster – Basel.
- Markaida, U. y Sosa-Nishizaki, O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995–1997. *Fisheries Research*, 54(1), 63–82.
- Marmon, S.K. y Undeland, I. (2010). Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 0480–10486.
- Martínez, V.A. Cruz, S.L.E. y Ricque, M.D. (2000). Composición corporal y proceso de secado del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Mar*, 4(11), 35-38.
- Nigmatullin, C.M. Nesis, K.N. y Arkhipkin, A.I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas*(Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 54, 9–19.
- Ojeda, Y. 2011. (2011, 28 de jun). Industrializarán calamar en Guaymas. *El imparcial*. Recuperado en: <http://www.elimparcial.com/EdicionEnLinea/Notas/Noticias/28062011/525166.aspx>
- Paredi, M.E. Tomas, M.C. y Crupkin, M. (2002). Thermal denaturation of myofibrillar proteins of striated and smooth adductor muscles of scallop (*Zygochlamys patagonica*). A differential scanning calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 830-834.
- Park, J.D. y Park, J.W. (2007). Extraction of sardine myoglobin and its effect on gelation properties of Pacific Whiting surimi. *Journal of Food Science*, 72(4), 202-207.
- Park, J.D. Yongsawatdigul, J. Choi, Y.J. y Park, J.W. (2008). Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs. *Journal of Food Science*, 73(3), C191-C197.
- Patrick, P.S. y Swaisgood H.E. (1976). Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high-temperatures heating and subsequent storage. *Journal of Dairy Science*, 59, 594-600.
- Perisic, N. Afseth, N.K. Ofstad, R. y Kohler, A. (2011). Monitoring protein structural changes and hydration in bovine meat tissue due to salt substitutes by Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10052–10061.
- Pilosof, A.M.R. 2000. Gelificación. En A.M.R Pilosof y G.B. Bartholomai (Eds). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. (pp. 97-123). Argentina: Ed. Universitaria de Buenos Aires.

- Privalov, P.L. Griko, Yu.V. V y Venyaminov S. Yu. (1986). Cold denaturation of myoglobin. *Journal of Molecular Biology*, 190(3), 487–498.
- Raghavan, S. y Hordur, G.K. (2007). Conformational and rheological changes in catfish myosin as affected by different acids during acid-induced unfolding and refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4144-4153
- Ramírez-Olivas, R. Rouzaud-Sánchez, O. Haard, N. Pacheco-Aguilar, R. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2004). Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*, 219, 312-315.
- Rawdkuen, S. Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M. y Benjakul, S. (2009). Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Food Chemistry*, 112, 112–119.
- Riebroy, S. Benjakul, S. y Visessanguan, W. (2008). Comparative study on acid-induced gelation of myosin from Atlantic cod (*Gardus morhua*) and burbot (*Lota lota*). *Food Chemistry*, 109, 42–53.
- Riebroy, S. Benjakula, S. Visessanguanb, W. Eriksonc, U. y Rustadd, T. (2009). Acid-induced gelation of natural actomyosin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and burbot (*Lota lota*). *Food Hydrocolloids*, 23, 26–39.
- Rodger, A. y Nordén, B. (1997). *Circular dichroism and linear dichroism*. (pp.15-23). Nueva York: Oxford University Press.
- Romero, A. Cordobés, F. Puppo, M.C. Villanueva. Á. Pedroche, J. y Guerrero, A. 2009. Linear viscoelasticity and microstructure of heat-induced crayfish protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 23, 964–972.
- Roos, Y.H. (2007). Phase transitions and transformations in food systems, en *Handbook of Food Engineering*, (Eds. Dennis L. Heldman y Daryl B. Lund), pp. 288- 352, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- Sahin, S. y Gülüm, S. (2006). *Physical Properties of Foods*. Recuperado en: [http://books.google.com.mx/books?id=-QEfJ\\_U9tAAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=-QEfJ_U9tAAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false).
- Salinas, Z.C.A. Augusto, C. Camarillo, C.S. Mejía, R.A. Sánchez, H.S. Sánchez, V.C. González, A.M. Flores, Q.F. y Beltrán, M.L.F. (2003). Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de calamar gigante, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México.
- Sánchez-González, I. Carmona, P. Moreno, P. Borderías, J. Sánchez-Alonso, I. Rodríguez-Casado, A. y Careche, M. (2008). Protein and water structural changes in fish surimi

- during gelation as revealed by isotopic H/D exchange and Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 106, 56- 64.
- Sánchez-Alonso, I. Haji-Maleki, R. y Borderías, J. (2006). Effect of wheat fibre in frozen stored fish muscular gels. *European Journal of Food Research and Technology*, 223, 571–576.
- Sánchez-Alonso, I. Careche, M. y Borderías, A.J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chemistry*, 100, 48-54.
- Stillings B.R. y Knobl G. (1971). Fish protein concentrate: a new source of dietary protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48(8), 412-414.
- Tadpichayangkoon, P. Park, J.W. Mayer, S.G. y Yongsawatdigul, J. (2010). Structural changes and dynamic rheological properties of sarcoplasmic proteins subjected to pH-shift method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4241–4249.
- Tanikawa, E. Motohiro, T. y Akiba. (1985). Marine Products in Japan. Koseicha Koseicha Co. Ltd. Tokyo, Japan.
- Taskaya, L. Chen, Y.C. y Jaczynski, J. (2009). Functional properties of proteins recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by isoelectric solubilization/precipitation. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1082–1089.
- Thawornchinsombut, S. y Park, J.W. (2004). Role of pH in solubility and conformational changes of pacific whiting muscle proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 28(2), 135-154.
- Thawornchinsombut, S. y Park, J.W. (2005). Roles of NaCl in solubility and conformational changes of Pacific whiting muscle proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 132–51.
- Thawornchinsombut, S. y Park J.W. (2007). Effect of NaCl on gelation characteristics of acid- and alkaline-treated Pacific whiting fish protein isolates. *Journal of Food Biochemistry*. 31, 427-455.
- Todokoro, H. y Ezumi, M. (1999). Scanning electron microscope. U.S. Patent Number: 5,872,358, February 16, 1999.
- Torres-Arreola, W. Pacheco-Aguilar, R. Sotelo-Mundo, R. Rouzaud-Sánchez, O. y Ezquerra-Brauer, J.M. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 101-108.
- Wang, C.H. y Damodaran S. Thermal gelation of globular proteins: weight-average molecular weight dependence of gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1157–1164.

- Winter, H.H. y Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at gel point. *Journal of Rheology*, 30(2), 367-382.
- Xiong, Y.L. y Blanchard, S.P. (1994). Myofibrillar protein gelation: viscoelastic changes related to heating procedures. *Journal of Food Science*, 59 (4), 734–738.
- Xiong, Y.L. (1997). Structure-function relationships of muscle proteins. En S. Damodaran y A. Paraf (Eds). *Food proteins and their applications*. (pp. 341–392). Nueva York, E.U.A.: Marcel Dekker Inc.
- Yongsawatdigul, J. Kim, Y.S. y Park, J.W. (2001). Biochemical and gelation properties of acid-and alkaline-aided solubilization of fish muscle proteins. Presented at Int'l Symposium, More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products. Kyoto University, Kyoto, Japan. Octubre 8-10.
- Yongsawatdigul, J. y Park, J.W. (2004). Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. *Journal of Food Science*, 69(7), 499–505.
- Yongsawatdigul, J. y Park, J.W. (2007). Effect of NaCl on gelation characteristics of acid-and alkali-treated Pacific whiting fish protein isolates. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 427-455.
- Yoshida, W. Kunimi, O. Fujiura, M. Kimura, M. Nozawa, H.y Seki, N. (2003). Thermal gelation of salted paste from scallop striated adductor muscle. *Fisheries Science*, 69, 1017–1025.