

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo del manto, aletas y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

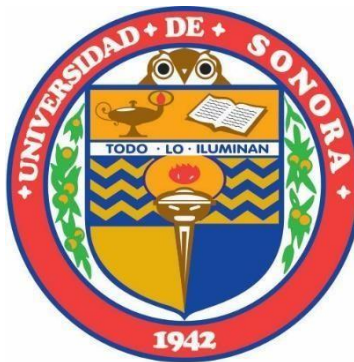
Presentan:

José Enrique Razcon Zavala
Angel Edgardo Tapia Vasquez

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2015

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

FORMA DE APROBACION

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **José Enrique Razcon Zavala** y **Angel Edgardo Tapia Vasquez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Wilfrido Torres Arreola
Director de Tesis

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario

Dra. Guadalupe Miroslava Suárez Jiménez
Vocal

cDra. Paola del Carmen Gastelum Aviña
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco sinceramente a nuestro director de tesis, Dr. Wilfrido Torres Arreola su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, orientaciones, paciencia y motivación han sido fundamentales para la realización de este trabajo. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con el por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta tesis de licenciatura. Muchas gracias.

También agradezco a nuestros sinodales, Dr. Aldo Arvizu, Dra. Miroslava Suarez y cDra. Paola Gastelum por cada crítica a nuestro trabajo, por sus ánimos, conocimientos y experiencia. Han hecho fácil lo difícil. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Un gran agradecimiento a mi compañero de tesis Angel Tapia, sin cuya colaboración este trabajo hubiera sido mucho más largo, complicado y menos entretenido. Por tus capacidades y conocimientos, y al buen trabajo en equipo, pudimos lograr esta meta, terminar la tesis y titularnos.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abrió sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

José Enrique Razcon Zavala

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis, en primer lugar me gustaría darle las gracias a Dios por guiar mis pasos y bendecirme con la oportunidad de culminar esta meta tan anhelada, me has dado lo más importante vida, salud y una hermosa familia.

Un gran y sincero agradecimiento para el Dr. Willfrido Torres Arreola mi asesor de tesis, por todo el conocimiento y la orientación que me ha brindado durante este tiempo. Por la oportunidad de trabajar a su lado y todo el apoyo que ha dado, tanto como asesor de tesis, persona y amigo. Sin usted no se podría haber terminado esta investigación.

También tengo que darle las gracias al Dr. Aldo Arvizu, la Dra. Miroslava Suarez y la cDr. Paola Gastelum por sus observaciones, gracias a ellas este trabajo puede concluirse de la manera más correcta. Gracias por las críticas y las preguntas en los seminarios, me enseñaron a afrontar estas situaciones que aparecerán de nuevo en un futuro.

A mi compañero y amigo Enrique Razcon Zavala, por su colaboración en este trabajo ya que sin su ayuda hubiera sido mucho más difícil llevarlo a cabo, gracias por todos los favores y tu ayuda amigo.

Finalmente un agradecimiento a mi alma máter por abrirnos la puerta a tantos jóvenes, por la calidad de profesores que nos preparan para un futuro competitivo, gracias a que entre en esta Universidad conocí a muchos amigos a lo largo de la carrera, son demasiados para nombrar a cada uno pero un agradecimiento especial para nuestro compañero de investigación Jesus Fimbres Romero.

Angel Edgardo Tapia Vasquez

DEDICATORIAS

Este trabajo se los dedico con mucho amor y cariño a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora.

También dedico este trabajo a mi novia, por tu bondad, paciencia, comprensión y sacrificio me inspiraste a ser mejor para tí, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí, gracias por estar siempre a mi lado.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño está tesis se las dedico a ustedes

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

José Enrique Razcon Zavala

DEDICATORIAS

Gracias a mis padres, por esas palabras de apoyo que siempre me han brindado y por esperar con ilusión este logro. Este trabajo se los dedico a ustedes por confiar tanto en mí, jamás voy a defraudarlos. Va para ti mamá por nunca dudar de mis capacidades y mi inteligencia. Va para ti papá por guiarme hasta donde estoy hoy. Los quiero mucho.

También se lo dedico a mis hermanos, Reyna Tapia estoy seguro que lograras cualquier cosa que te propongas en esta vida porque conozco tus habilidades y la devoción que pones en lo que haces, espero que este logro te motive a seguir adelante con tus metas. Leonardo Tapia este logro también es dedicado a ti y espero te sirva como un buen ejemplo, para que sepas que puedes alcanzar cualquier reto que te pongas en la vida.

Una dedicatoria muy especial para mi novia, mil gracias por tu paciencia ya que este tipo de trabajos llegan a ocupar tiempo de mi atención, por compartirme tu cariño cuando más lo necesito y por motivarme a exigirme más a mí mismo para ser una persona mejor preparada, no solo para ti sino también para mí. Espero llenarte de orgullo Mayra Leos Fimbres.

A mis amigos Alejandro Soltero, Abraham Encinas y Juan Valenzuela, por siempre brindarme su ayuda, por hacerme olvidar el estrés de la tesis cuando era necesario. Este trabajo también es para ustedes.

A todos los profesores que con sus conocimientos me apoyaron a escribir esta tesis, Dr. Pablo Osuna, Dr. Enrique Marquez, Dra. Miroslava Suarez, Dra. Ofelia Rouzaud entre muchos otros, esta dedicación es para todos ustedes.

Angel Edgardo Tapia Vasquez

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	5
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	14
Generalidades del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	14
Pesquería en Sonora	17
Composición química del calamar gigante	18
Proteínas musculares	19
Proteínas miofibrilares	20
Proteínas sarcoplásmicas o solubles	20
Proteínas del tejido conectivo	21
Propiedades funcionales de las proteínas musculares	21
Solubilidad	22
Colágeno	23
Características del colágeno	24
Solubilidad del colágeno	27
Efectos del tratamiento pos captura del calamar	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIALES Y MÉTODOS	33
Obtención de la materia prima	33
Extracción de las diferentes fracciones de tejido conectivo	33
Análisis de proteínas	33
Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida	34
Calorimetría diferencial de barrido	34
Composición de aminoácidos	34

Perfil de textura	35
Análisis estadístico	35
RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
Extracción de las diferentes fracciones de tejido conectivo	36
Cambios en la solubilidad del tejido conectivo	38
Evaluación del peso molecular	40
Resistencia térmica	43
Composición de aminoácidos	48
Perfil de textura	50
CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

No. Figura		Página
1	Morfología del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	15
2	Representación de la composición del tejido en el manto del calamar	16
3	Distribución del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en el océano pacífico y áreas de pesca en el noroeste de México	19
4	Esquema de una fibra de colágeno	26
5	Gráfico que muestra la solubilidad del tejido conectivo del músculo de aleta, manto y tentáculo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante su almacenamiento en hielo	39
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) del tejido conectivo extraído de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) realizados a lo largo de 20 días. Imagen: (a) Tejido conectivo soluble en sal de aleta, (b) tejido conectivo soluble en sal de manto y (c) tejido conectivo soluble en sal de tentáculo. STD: marcador de peso molecular	41
7	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) del tejido conectivo extraído de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) realizados a lo largo de 20 días. Imagen: (d) tejido conectivo soluble en pepsina de aleta, (e) tejido conectivo soluble en pepsina de manto y (f) tejido conectivo soluble en pepsina de tentáculo. STD: marcador de peso molecular	42
8	Termogramas del tejido conectivo soluble en sal (TCSS) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante su almacenamiento en hielo	44
9	Termogramas del tejido conectivo soluble en pepsina (TCSS) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante su almacenamiento en hielo	45
10	Termogramas del tejido conectivo insoluble (TCSS) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante su almacenamiento en hielo	46

LISTA DE TABLAS

No. Tabla		Página
1	Contenido y distribución de tejido conectivo, fracción insoluble del tejido conectivo, hidroxiprolina y colágeno insoluble extraído de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	37
2	Concentración de aminoácidos presentes en TCSS, TCSP y TCI de aleta, manto y tentáculo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	49
3	Cambio en la fuerza requerida para el corte del musculo de las diferentes regiones anatómicas del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante su almacenamiento en hielo	50

RESUMEN

Se evaluaron los cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo a través de extracciones en base a la capacidad de las proteínas de ser solubilizadas por dos solventes distintos: un buffer de sal neutra (Tris/ 1M NaCl 0.05 M, pH 7.2) y pepsina (10 mg/g de tejido en ácido acético, CH₃COOH 0.5 M). El remanente final que no pudo ser solubilizado en sal ni en pepsina se le consideró como tejido conectivo insoluble.

Se utilizaron diversas metodologías como electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), calorimetría diferencial de barrido y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), para así observar como repercuten estos cambios estructurales en la textura del músculo a través de una medición de la resistencia al corte.

Se determinó el contenido del tejido conectivo de las tres regiones anatómicas del calamar estudiadas, de las cuales los tentáculos fueron la región donde se obtuvo mayor cantidad de tejido conectivo (4.98 g / 100 g de músculo) en comparación con aletas y manto; así como de la fracción insoluble. En la evaluación de los pesos moleculares se observaron diferentes bandas en los perfiles electroforéticos de tejido conectivo soluble en sal y tejido conectivo soluble en pepsina, de las cuales se destaca una banda a los 66 kDa a lo largo de los 20 días de almacenamiento que es atribuida a elastina, otras a los 97-116 kDa que se relacionan con colágeno, ambas proteínas componentes del tejido conectivo.

En cuanto al perfil de aminoácidos se mostró una mayor concentración de glicina, prolina, hidroxiprolina, cisteína y lisina, siendo prolina e hidroxiprolina aminoácidos exclusivos del colágeno. Finalmente se encontró una disminución y un aumento en la solubilidad y la resistencia térmica respectivamente, que repercutió en la firmeza del músculo a lo largo del almacenamiento en hielo, alcanzando en el día 10 la capacidad máxima de resistencia al corte.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es uno de los cefalópodos de mayor talla, más abundantes, de crecimiento rápido, con un sistema visual bien desarrollado y un sistema nervioso complejo (Roper y col., 1984). Se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde la frontera de México y Estados Unidos hasta Chile; siendo los mayores productores los estados de Sonora y Baja California Sur, con el 88 % de la producción con respecto al total nacional (SAGARPA, 2009). Ocupa el segundo lugar entre las especies más capturadas en Sonora, registrándose capturas alrededor de 100,000 toneladas durante varios años (Markaida, 2005). La importancia económica del calamar gigante está directamente relacionada con el volumen de captura, ya que al ser un producto barato, es necesario obtener grandes cantidades del recurso (Gaxiola, 2011; Klomklao, 2008). Sin embargo, durante su pesquería sólo se aprovecha la parte comestible (42 %), mientras que el resto del organismo es desechado, donde en términos generales, después del fileteado, se pueden generar hasta un 75 % del peso de la captura total en forma de huesos, aletas, cabezas y vísceras. Tales desechos pueden ser utilizados para extraer proteínas, pigmentos, vitaminas, minerales y enzimas con un potencial valor económico (Torres-Arreola y col., 2008). Entre los principales componentes de los subproductos de calamar gigante se encuentra el tejido conectivo (≈ 30 %), el cual puede ser empleado para la producción industrial de colágeno y gelatina con fines cosméticos o de alimentos balanceados para animales, dándole así un valor agregado a la pesquería de este organismo e impulsando un desarrollo sustentable y redituable (Shahidi, 2007).

Por otro lado, el colágeno (proteína mayoritaria del tejido conectivo), juega un papel muy importante en cualquier tejido animal, ya que es el encargado de la unión entre varias células, de ahí que exista una estrecha relación entre su comportamiento y la firmeza del músculo, lo cual depende del grado de entrecruzamiento que presenten sus fibras. En organismos marinos, su concentración depende de múltiples factores, que van desde la edad, sexo, especie o incluso hasta la temperatura del agua en la cual crecen y se desarrollan los organismos (Ando y col., 2006). En calamar gigante, se han evaluado diferentes propiedades y características del colágeno, como: su concentración en el manto (Sikorski y Kolodziejska, 1986), solubilidad (Ando y col., 1996 1999, 2001; Borderias y Montero, 1985; Sato, 1997), estabilidad térmica (Sikorski y Borderias, 1994); sin embargo existe poca información con respecto al contenido de colágeno, tejido conectivo y sus características estructurales (Torres-Arreola y col., 2008). Se presupone que dichas características pueden variar dependiendo del nivel de entrecruzamiento que presenten las fibras de colágeno, por efecto de la formación de una molécula llamada

piridinolina, la cual tiene la capacidad de entrecruzar hasta tres moléculas de colágeno. Lo anterior se puede ver influenciado por el manejo postcaptura del producto. En este sentido, está ampliamente documentado que, durante el almacenamiento en hielo, congelación o cocción, las proteínas sufren cambios conformacionales que pueden conducir a su agregación, haciendo así el músculo más duro y tenaz (Ando y col., 1999; Badii y Howell, 2002; Paredi y col., 2006). En función de lo anteriormente expuesto, el objetivo central de esta investigación es evaluar los cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo del manto, aletas y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante un almacenamiento en hielo y relacionarlo con la textura de su músculo.

ANTECEDENTES

Generalidades del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

El calamar gigante es un cefalópodo de la familia *Ommastrephidae* que se encuentra en abundancia en la costa del Pacífico de México (Martínez-Aguilar y col., 2004). Son invertebrados marinos carnívoros que se mueven en cardúmenes de hasta 1,200 animales, nadan a una velocidad de hasta 24 km/h propulsados por agua expulsada a través de un sifón y por dos aletas triangulares. Sus tentáculos tienen entre 100 y 200 ventosas agrupadas (Markaida, 2001), cada uno alineado con los dientes afilados, con los que captan la presa y arrastran hacia el pico de perico. El calamar gigante puede crecer hasta 1,9 m de longitud del manto (Glaubrecht y col., 2004) y pesar hasta 50 kg (Nigmatullin y col., 2001). Por lo general, el manto (o cuerpo) constituye aproximadamente el 40 % de la masa total del animal, las aletas aproximadamente el 12 %, los brazos y tentáculos alrededor de 14 %, la piel exterior alrededor del 3 %, la cabeza (incluyendo ojos y el pico) aproximadamente 5 % y el 26 % restante compuesto por los órganos internos (Norman, 2000). En la figura 1 se muestra la morfología del calamar gigante (Young, Richard E., 2009).

El calamar gigante se caracteriza por tener un cuerpo en forma cilíndrica denominada manto, el cual cumple la función de envolver y proteger los órganos internos (Moreno-Martínez, 2011). El manto está compuesto de cinco diferentes capas de tejido, la capa dominante está formada por bandas ortogonales (Lluch y col., 2001) de fibras musculares, intercaladas entre dos túnicas de tejido conectivo. Las túnicas interna y externa están cubiertas por un revestimiento visceral y uno exterior, respectivamente. Cada fibra contiene en su periferia una determinada cantidad de miofibrillas. El centro está representado por el sarcoplasma con mitocondrias y núcleo.

La túnica exterior consiste de capas de fibras de colágeno adyacentes a la capa externa, compuesta también de fibras de tejido conectivo, las cuales se ubican justo por debajo de la piel. La túnica interna, la cual tiene ligeramente ligados e interconectados agregados fibrosos, está cubierta por una capa visceral no fibrosa (Otwell y Giddings, 1980). El radio del manto se reduce poco a poco, cada vez más en la región de inserción de las aletas, terminando como punta cónica. El borde de la base del manto en su porción ventral está ligeramente vuelto hacia afuera y hacia arriba, entre los cartílagos de unión del manto con el sifón. Contiene una estructura interna cartilaginosa llamada comúnmente pluma, la cual da soporte a los músculos

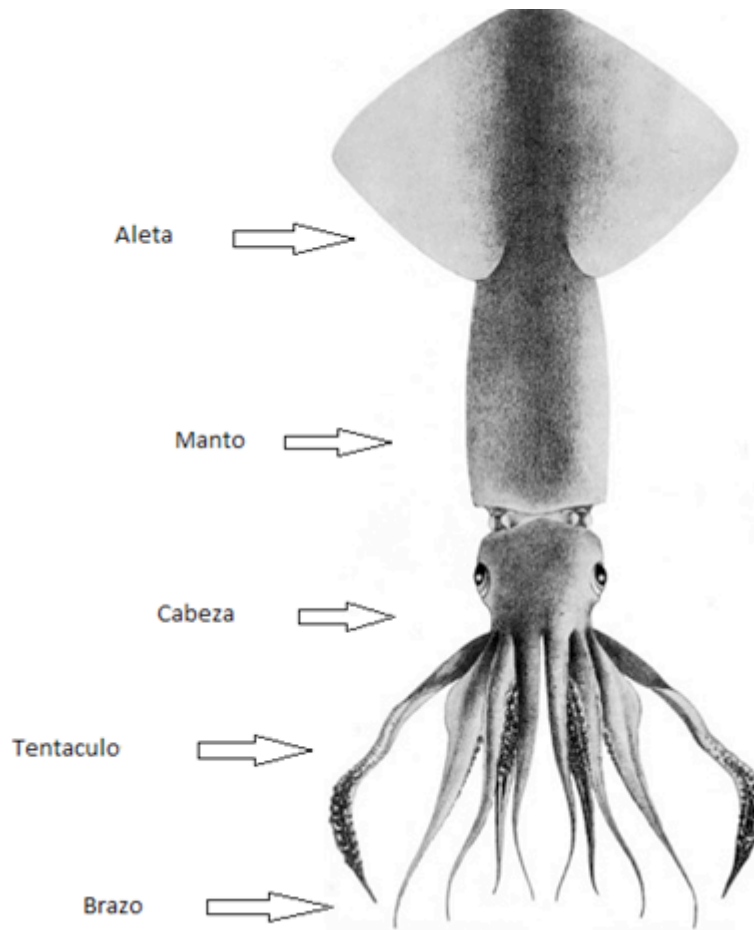


Figura 1. Morfología del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Fuente: Young, Richard E. (2009).

del cuerpo del calamar, está compuesta principalmente de quitina y generalmente se extiende a lo largo del manto (Young, 2009). En la figura 2 se observa una representación de la composición del tejido en el manto del calamar gigante (Murrieta-Martínez, 2011). Posee además en un extremo dos aletas laterales muy amplias de forma romboidal (Nesis, 1987) mientras que en el extremo opuesto se localiza la cabeza, boca, tentáculos y brazos. Otra característica distintiva de *Dosidicus gigas* es la foveola, que es una hendidura que cede espacio al sifón en la porción posterior de la cabeza; y el cartílago de unión del manto con la cabeza presenta una bifurcación en forma de “T” invertida característica de la familia *Ommastrephes* (Moreno-Martínez, 2011).

El calamar gigante presenta una amplia distribución en el Pacífico Oriental, comprendiendo las costas de los Estados Unidos hasta las de Chile, encontrándose las áreas

de mayor concentración frente a las costas de Perú y México. Llegan a formar grandes agrupaciones y en ocasiones los podemos encontrar varados en las playas en cantidades abundantes (Klett, 1996). Es una especie endémica, se concentra en el Mar de Cortés (Golfo de California), específicamente en las zonas de Guaymas y Santa Rosalía, obteniéndose las mayores capturas en los meses de noviembre a mayo en la primera zona y de mayo a octubre en la segunda. Se distingue por sus características biológicas, en las que destacan una alta fecundidad y elevada tasa de crecimiento, por lo que se puede disponer de la materia prima durante todo el año.

Los calamares gigantes se venden normalmente en forma de manto congelado o cocido (Luna y col., 2006). Sin embargo, la congelación y la cocción pueden afectar las propiedades funcionales de las proteínas resultando en cambios en las propiedades reológicas (Ando y col., 1999; Badii y Howell, 2002; Paredi y col., 2006), que alteran la textura y calidad comestible de los organismos marinos, provocando de esta manera el desperdicio de una fuente de proteína

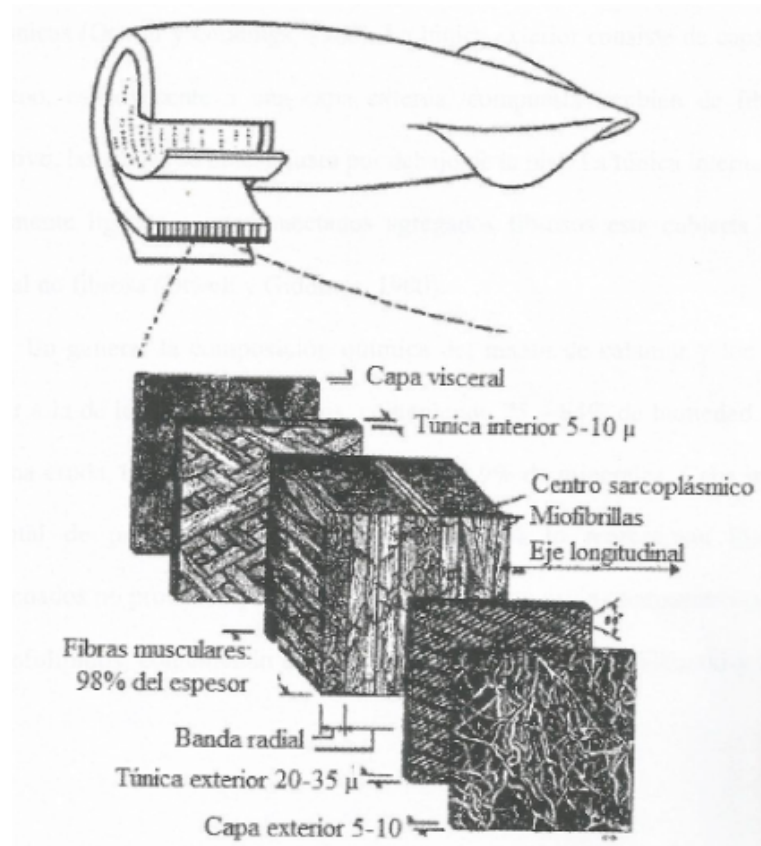


Figura 2. Representación de la composición del tejido en el manto del calamar.

Fuente: Murrieta-Martínez, (2011).

rica y escasa (Paredi y col., 2006). Además durante la congelación o cocción, las proteínas sufren cambios conformacionales que conducen a su agregación, haciendo así el músculo más duro, tenaz y menos succulento (Ando y col., 1999; Badii y Howell, 2002; Paredi y col., 2006). Se ha encontrado que el colágeno, componente principal del tejido conectivo (Foegeding y col. 1996) tiene una estrecha relación con la textura. Por lo tanto, las proteínas y sus propiedades funcionales se modifican al ser extraídas por el proceso tecnológico del que se trate. Las más afectadas son las proteínas miofibrilares y estromales (Badii y Howell, 2003; Paredi y col., 2006).

Cuando el calamar es capturado, un número de cambios significativos ocurren en la carne, lo que resulta en modificaciones en la textura (Ramírez-Olivaz y col., 2004). Aunque, los cambios en la textura se han atribuido principalmente a proteínas miofibrilares, se producen modificaciones también en las proteínas del tejido conectivo, como el colágeno (Kagawa y col., 2002). Estos cambios posteriores a la captura podrían tener implicaciones en el producto final, si está destinado a la elaboración de alimentos, que afecta a la calidad sensorial, química o microbiológica. Por otra parte, es importante para entender el comportamiento de las enzimas musculares del calamar desde el punto de vista de los residuos de la industria pesquera, debido a que más del 50% del calamar gigante no se utiliza como alimento (Salinas y col., 2005).

Pesquería en Sonora

El estado de Sonora se localiza en la región pesquera del Pacífico norte que es la zona más productiva del país. Actualmente el estado de Sonora contribuye con el 45 % del total nacional pesquero, siendo el primer productor pesquero nacional con un aporte total de 808,380 toneladas. De ahí que una de las actividades económicas más importantes en Sonora sea la pesca. El estado cuenta con un litoral de 1,207 km, el cual corresponde al 11 % del total nacional. La actividad pesquera tiene lugar principalmente en: Guaymas, Puerto Peñasco y Yavaros, siendo en el primero donde se concentra el mayor volumen de producción, exportaciones, infraestructura pesquera y como consecuencia, generación de empleos. En la figura 3 se muestra la distribución del calamar gigante en el océano pacífico y áreas de pesca en el noroeste de México. Aunque el crecimiento de la pesquería en México ha sido espectacular, grandes contrastes han caracterizado esta pesquería. Los esfuerzos de pesca y procesamiento locales no son compatibles con los procesos tecnológicos de gestión apropiada. Por lo tanto, las pesquerías locales están en desventaja cuando se trata de competir por

mejores mercados (Luna y col., 2006). En Sonora, la pesca se ha destinado principalmente a sardina y camarón. Sin embargo, en los últimos años, se han tomado medidas para fomentar y estimular la utilización de otros recursos pesqueros, como el calamar gigante, ostras, cangrejos, entre otros (Márquez-Ríos, 2007). Recientemente las principales pesquerías de la región siguen siendo camarón, sardina y calamar gigante, siendo líder nacional en esta última con un aporte de 50.93 % del total capturado en el litoral del Pacífico (SAGARPA, 2009).

Por las características de comportamiento del calamar, su captura es nocturna. El modo de la operación de pesca consiste en situarse en el área de pesca, encender luces de atracción y esperar a que el calamar, que presenta fototropismo positivo, responda a la luz concentrándose en la zona de penumbra bajo la embarcación, desde donde ataca a cualquier presa disponible, incluyendo los señuelos. El producto se recibe en zonas cercanas al sitio de pesca.

La captura promedio por panga es entre 500 y 1000 kg por jornadas de trabajo que varían entre cinco y seis horas, y por embarcación entre 200 y 700 kg por jornada que es de 8.5 horas, incluyendo la transportación desde el caladero, el desembarque y el eviscerado del producto. El eviscerado generalmente se hace dentro del mar en áreas cercanas a la zona de desembarque. La pesquería de calamar no tiene interacción directa con otras pesquerías dadas las características del método de captura, no obstante hay una preferencia de la flota camaronera del Golfo de California a incorporarse a la pesquería de calamar gigante, cuando la temporada de camarón en el Pacífico mexicano entra en veda (Hernandez 1998).

Composición química del calamar

La composición química del músculo del calamar gigante, varía dependiendo de algunos factores como: sexo, talla, alimentación, temporada y localización de la captura, entre otros. Existen muchas variaciones en cuanto a la composición química se refiere, de especie a especie, así como también dentro de la misma especie y estas variaciones en la composición del músculo pueden ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia (Sikorski, 1990). En general la composición química del manto de calamar y los tentáculos es similar a la de los pescados magros, conteniendo 75-84 % de humedad, 13-22 % de proteína cruda, 0.1-2.7 % de lípidos y 0.9-1.9 % de minerales.

Cabe mencionar que del total de proteína cruda, alrededor del 37 % lo representan los compuestos nitrogenados no proteicos y que los lípidos del manto están compuestos

principalmente por fosfolípidos, conteniendo alrededor de 4% de colesterol (Sikorksi y Kolodziejska, 1986). Dentro de estos compuestos nitrogenados se encuentran el óxido de

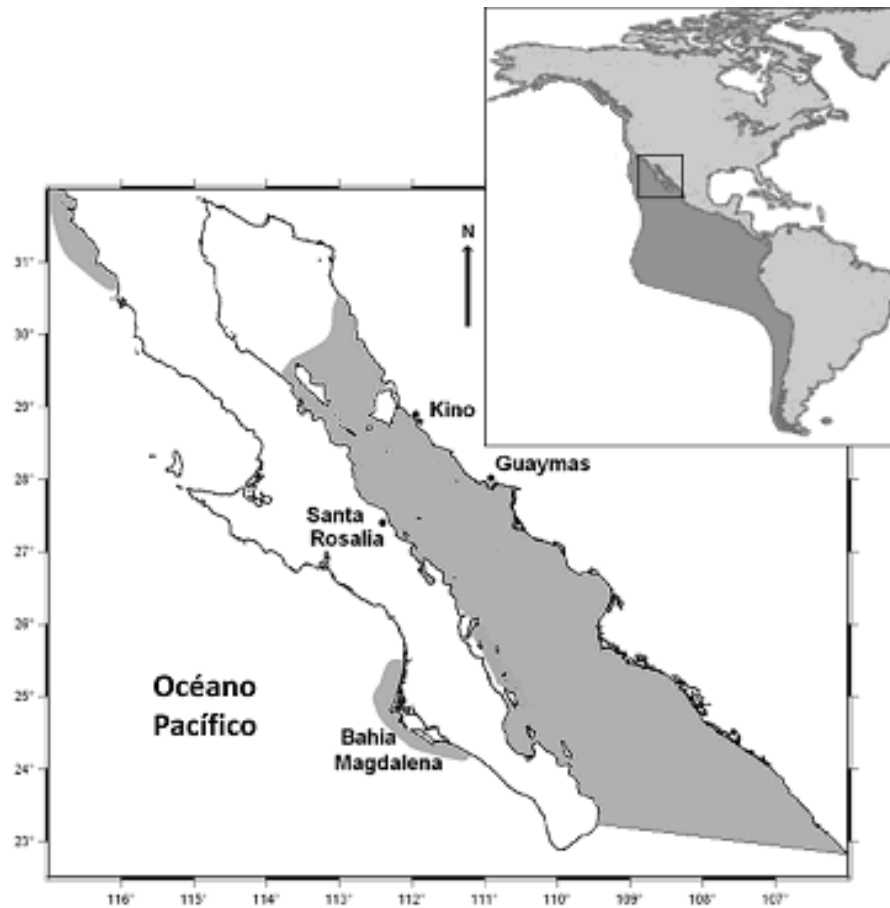


Figura 3. Distribución del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el océano Pacífico y áreas de pesca en el noroeste de México.

Fuente: Diario Oficial de la Federación, (2014).

trimetilamina, aminoácidos libres, octopina, betainas y nucleótidos, a quienes en conjunto por presentar altas concentraciones de nitrógeno monoaminado, se les atribuye el sabor ácido-amargo característico del calamar (Luna y col., 2006).

Proteínas musculares

El músculo de cualquier animal contiene un gran número de proteínas que difieren en el peso molecular, cantidad de aminoácidos, composición y estructura espacial. Estas diferencias

afectan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas como lo son: solubilidad, estabilidad. (Fenemma, 2000). Las proteínas del músculo se dividen en tres grupos en base a su solubilidad, como proteínas contráctiles o miofibrilares, proteínas sarcoplásmicas o solubles y proteínas del estroma o insolubles (Badui, 2005). De estas, 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 sarcoplásmicas constituyen del 30 al 35 % y son las que se encuentran en el sarcolema. Y por último, las estromales, que constituyen del 10-20 % y componen mayormente el tejido conectivo (Sikorski, 1994). Si bien esto se cumple para todos los organismos, en el caso del calamar se presentan ciertas diferencias, las cuales podrían deberse a su estructura tisular (Cortes-Ruiz y col., 2008); el manto está formado por fibras musculares circulares que, a intervalos más o menos regulares son interrumpidas por secciones de fibras orientadas radialmente, que funcionan para “adelgazarlo” y hacer que la cavidad de este se extienda de acuerdo con la fuerza del golpe de las fibras circulares (Fennema, 2000).

Proteínas miofibrilares

Las proteínas miofibrilares forman el más grande grupo de proteínas, ya que constituyen el 55-60% del total de proteínas del músculo (Xiong, 1997). Conforman estructuralmente el tejido muscular y se encargan de la transformación de energía química en mecánica durante la contracción y relajación de los diversos músculos. Como ya se dijo, son la fracción más abundante; son solubles en soluciones salinas concentradas y basándose en su localización, se pueden dividir como filamentos gruesos (miosina, proteína C, proteína M) y delgados (actina, tropomiosina, troponina, alfa actina, beta actina) (Badui, 2005) y según su función, como proteínas generadoras de fuerza o reguladoras (Dihort-García, 2010).

Proteínas sarcoplásmicas o solubles

Las proteínas sarcoplásmicas son proteínas que se localizan dentro del sarcolema, estos polipéptidos también se conocen con el nombre genérico de miógeno y son fundamentalmente globulinas y albúminas pertenecientes a los sistemas que intervienen en el metabolismo celular (Badui, 2005). Estas son proteínas solubles en agua y en disoluciones salinas de baja molaridad (<50 mM) y comprenden cerca del 30 - 35% de las proteínas totales del músculo (Xiong, 1997). Este grupo de proteínas se caracteriza por ser buenos agentes emulsionantes y retener una gran cantidad de agua, lo que evita pérdidas de humedad durante

el proceso de cocción; tienen la capacidad de coagular y de formar geles (Badui, 2005). La mioglobina es presuntamente la más importante debido a que es la responsable del color de la carne, sin embargo el calamar posee hemocianina en vez de mioglobina (Kijowski, 2001).

Proteínas del tejido conectivo

El tejido conectivo está formado por diversas fibras (colágeno), varios tipos de células diferentes y una sustancia denominada lámina basal (Fennema, 2000). Constituyen el 10-20% de las proteínas del tejido muscular. Estas son insolubles en agua o en soluciones salinas y se constituyen fundamentalmente por proteínas del tejido conectivo tales como: colágeno, reticulina y elastina (Beltran, 2000). Este grupo conforma el tejido conectivo de los tendones, así como a las proteínas de las membranas y proteínas insolubles contráctiles como la desmina y conectina (Hultin, 1993). La carne de calamar presenta propiedades de mayor firmeza, debido a su estructura de tejido conectivo único. Las fibras musculares y de tejido conectivo de calamar son más fuertes que las de músculo de pescado y su disposición es también muy diferente (Ramirez-Olivas, 2004). El colágeno es el más abundante y está constituido por diversas fracciones. Existe también, una estrecha relación entre la firmeza del músculo y el comportamiento del colágeno en organismos marinos (Torres-Arreola y col., 2008).

El colágeno, específicamente en el calamar gigante, participa en los mecanismos natatorios del organismo y su contenido es diferente para cada región anatómica (manto, aletas, tentáculos). Siendo así, que los tentáculos presentan el mayor contenido de colágeno insoluble (CI), no obstante se ha observado por microscopia electrónica de barrido (MEB) un arreglo estructural similar en el colágeno soluble en pepsina (CSP) de las tres regiones y en el CI, marcadas diferencias en el empaquetamiento de las fibras (Torres-Arreola y col., 2008). Las propiedades de las proteínas (colágeno en particular) se pueden utilizar como puntos de referencia de la calidad muscular.

Propiedades funcionales de las proteínas musculares

En términos generales, las propiedades funcionales se definen como cualquier propiedad fisicoquímica de las proteínas que afectan y modifican algunas características de un alimento durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo; y que además contribuyen a la calidad y atributos sensoriales del producto final (Badui, 1993; Fennema, 2000). Dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula, como el tamaño,

la forma, la composición y la secuencia aminoacídica, la carga neta y distribución de las cargas, el cociente hidrofobia/hidrofilia y las estructuras (secundaria, terciaria y cuaternaria). Así como también dependen de factores extrínsecos del medio que las rodea, como son el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la actividad acuosa, la constante dieléctrica y la interacción con otros constituyentes del alimento (solvente, iones, gases u otras macromoléculas) (Badui, 1993; Fennema, 2000; Sikorski, 2001).

De acuerdo a su mecanismo de acción las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar en:

- a. Propiedades de hidratación (interacción proteína-agua), como la capacidad de retención de agua, solubilidad, capacidad de espesamiento y humectación.
- b. Propiedades relacionadas con la estructura de la proteína y características reológicas (interacción proteína-proteína), como la viscosidad, elasticidad, adhesividad, agregación y gelificación.
- c. Propiedades relacionadas con la superficie proteica (tensión superficial), como la capacidad emulsionante y espumante, formación de películas proteína - lípido, formación de pastas o batidos (Guerrero y Totosaus, 2006; Borderías y Montero, 1988).

Solubilidad

La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones de proteína-proteína y proteína-disolvente. Se define como el porcentaje de proteína contenida en un alimento, que es extraíble con agua o con solución salina en condiciones especificadas (Sikorski, 2001). Las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por la solubilidad proteica; las más afectadas son las propiedades espesantes, espumantes, emulsificantes y gelificantes (Fennema, 2000; Kijowski, 2001). También se define como la cantidad de proteína que se mantiene en solución después de aplicar el sistema de una fuerza centrífuga por un tiempo predeterminado (Hultin y col., 1995; Guerrero y col., 2009).

La solubilidad de las proteínas es variable y es influenciada por el número de grupos polares y apolares; y su disposición a lo largo de la molécula. La solubilidad en agua depende del pH y la concentración de sal (Belitz y col., 2009). Las variaciones en el pH del medio afectan la solubilidad de las proteínas musculares, ya que se modifica su ionización y carga neta, alterando sus fuerzas atractivas y repulsivas, y la aptitud para asociarse con agua (Kim y col., 2003). La solubilidad disminuye en el punto isoeléctrico, ya que las cargas negativas y positivas en las moléculas de proteína se igualan y tienden a asociarse a través de enlaces iónicos e

interacciones hidrofóbicas (Lin y Park, 1998). A pH superiores e inferiores al punto isoeléctrico, la proteína adquiere un incremento en su carga neta negativa o positiva, respectivamente. Estas cargas generan nuevos sitios activos de unión para el agua y resultan en la repulsión entre moléculas de proteína, incrementando su superficie de hidratación y en consecuencia, su solubilidad (Lin y Park, 1998; Choi y Park, 2002; Kristinsson y Ingadottir, 2006).

La solubilidad de las proteínas también es afectada por la fuerza iónica (I) de la solución salina usada. Las proteínas miofibrilares muestran un aumento en su solubilidad (Salting-in) con el incremento en las concentraciones de sal (0.5 a 1 M) (Kim y col., 2003), seguido por su disminución (salting-out) con posteriores adiciones de sal (> 1M). Así pues, altas concentraciones de sal tienden a desnaturalizar las proteínas. En cuanto a la temperatura, las propiedades de hidratación de las proteínas disminuyen cuando la temperatura se incrementa, debido a la disminución en la capacidad de formar enlaces de hidrógeno. Las temperaturas elevadas tienen a desnaturalizar a las proteínas disminuyendo la capacidad de interacción de sus grupos polares con el agua (Borderias y Montero, 1988).

Colágeno

El colágeno es la principal fracción del tejido conectivo. Este componente es muy importante debido a que contribuye de manera significativa a la dureza del músculo. El colágeno abunda en los tendones, piel, hueso, sistema vascular de los animales y en las vainas de tejido conectivo que envuelve al músculo. El colágeno alcanza un tercio o más del total de proteínas de un organismo. Alrededor del 10 % de la proteína del músculo es colágeno. Parte del colágeno es soluble en disoluciones salinas neutras, otra parte es soluble en ácido y una tercera es insoluble.

Los polipéptidos del colágeno son casi todos helicoidales con la excepción de unos pocos residuos en cada extremo. Sin embargo, las hélices difieren de la alfa hélice típica debido a la abundancia de hidroxiprolina y prolina que interfieren con la estructura alfa helicoidal. Las moléculas de colágeno se unen extremo a extremo y adyacentemente para formar las fibras de colágeno. Existe una periodicidad en la estriación transversal del colágeno a intervalos de 640-700 Å aproximadamente. Las fibras de colágeno a veces se encuentran organizadas en paralelo para conseguir gran fuerza, como los tendones, o pueden estar altamente ramificadas y desordenadas como la piel. La composición en aminoácidos del colágeno esta desequilibrada desde el punto de vista nutritivo y es singular en diversos aspectos. El colágeno carece casi de triptófano; es rico en glicina, hidroxiprolina y prolina; es una de las pocas proteínas que contiene

hidroxilisina. La glicina representa casi un tercio del total de los residuos y está distribuida uniformemente en cada tercera posición a lo largo de casi toda la molécula de colágeno. El colágeno es la única proteína rica en hidroxiprolina (hasta el 10 % en el colágeno de mamíferos); sin embargo, los colágenos de pescado contienen una cantidad menor de estos aminoácidos, mientras que hay muy poca información respecto a invertebrados como el calamar. Debido a cuenta que la hidroxiprolina está presente en cantidades significativas en el colágeno y en muy pequeñas en otras proteínas, con frecuencia se utiliza para determinar la cantidad del colágeno de las muestras de alimentos. La presencia de prolina estabiliza la estructura helicoidal impidiendo la rotación del enlace N-C. La hidroxiprolina también estabiliza la molécula de colágeno y los colágenos que contienen pequeñas concentraciones de ambos iminoácidos se desnaturalizan a temperaturas inferiores que los que los contienen en grandes concentraciones. El contenido en iminoácidos de los colágenos de pescado, por lo tanto, su estabilidad térmica, se correlaciona con la temperatura del agua de su hábitat normal. El contenido en proteoglicanos y glicoproteínas también afecta a la estabilidad térmica del colágeno.

A medida que los animales envejecen, los enlaces cruzados de colágeno se convierten de la forma reducible a una forma no reducible más estable. Se desconoce la naturaleza del enlace cruzado no reducible "maduro". Aunque, se supone que estos enlaces no reducibles engloben diversos grupos funcionales en una extensa red polimérica. Donde los enlaces cruzados intermoleculares se confinan a la región de solapamiento del extremo implicado a la lisina aldehído del telopéptido de una cadena helicoidal y la hidroxilisina de la región helicoidal de una cadena adyacente. El número de enlaces cruzados del colágeno aumenta con la edad, lo cual explica parcialmente porque la carne de los animales viejos es más dura que la de los animales jóvenes, a pesar de que los músculos de los animales más jóvenes generalmente contienen más colágeno. A medida que aumentan los enlaces cruzados del colágeno, éste se hace menos soluble en diversos disolventes, como disoluciones salinas y ácidas.

Características del colágeno.

El colágeno se sabe que puede estar presente en diferentes formas. Al menos veinte diferentes formas de colágeno han sido descritas en detalle en vertebrados, aunque el conocimiento en la distribución, propiedades y funciones del colágeno en invertebrados es aún muy pobre. Los colágenos de pescado han sido difíciles de purificar debido a interferencias de proteínas miofibrilares que no son colágeno (Sivakumar y col. 1997). El contenido de colágeno

en el músculo de pescado es más bajo que el de los mamíferos, en una proporción de 1 a 20 % del total de la proteína y del 0.2 al 2.2 % de peso del músculo (Love y col. 1982). El mayor contenido de colágeno se encuentra en la musculatura flexible usada para propulsión (Sivakumar y col. 1997). Al menos cuatro tipos de colágeno (I, III, IV y V) han sido identificados en los mamíferos y en el músculo de las aves (Belitz y Grosch. 1999). También se han detectado diferencias en el contenido de aminoácidos entre el colágeno de pescado y de los mamíferos. En peces existe una menor concentración de hidroxiprolina, de 4.7 a 10.9 % de hidroxiprolina en colágeno de bovino. Se sabe que la hidroxiprolina estabiliza al colágeno, de ahí la mayor desnaturalización del colágeno de pescado a baja temperatura (Love y col. 1982).

Recientemente se purificó colágeno tipo V del músculo de *Peaeus japonicus*, sin embargo las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de los colágenos de crustáceos no se han investigado a detalle. En *Penaeus indicus* se aisló mediante digestión con pepsina un colágeno que en base a su composición de aminoácidos, patrón electroforético y precipitación con sal, se estableció que era similar al tipo V de los vertebrados. En base a los estudios bioquímicos se estableció que posee menor cantidad de asociaciones a carbohidratos y un mayor contenido de alanina, con temperaturas de desnaturalización de 37° C, con una viscosidad de 11.3 dl/g (Sivakumar y col. 1997). En algunos langostinos como el *Macrobrachium rosenbergii* se reportó que el colágeno presente en su músculo contiene una composición inusual de aminoácidos, ausencia de hidroxilisina y bajo contenido de glicina (Nip y col. 1981). En *Penaeus setiferus* se ha reportado un bajo contenido de glicina y alto contenido de triptófano (Kimura y Tanaka, 1986).

El colágeno se ha detectado en una concentración de aproximadamente 3 a 11,1 % en el manto de calamar (Sikorski y Kolodziejska, 1986). La estructura básica conocida como tropocolágeno, la cual es una molécula de forma cilíndrica integrada por tres cadenas polipeptídicas de PM de 100 kDa cada una, se enrollan a lo largo de un eje para producir una triple hélice; las tres proteínas se enlazan entre sí a través de muchas uniones intermoleculares cruzadas que le confieren gran rigidez a la estructura y muy baja solubilidad. A su vez, la interacción de las moléculas de tropocolágeno producen fibras que dan origen al colágeno propiamente dicho (Badui, 2005). El monómero mide unos 2800 Å de longitud y 14-15 Å de diámetro. El colágeno se polimeriza a través de la formación de entrecruzamientos covalentes. Estos entrecruzamientos se vuelven cada vez más termoestables cuando el colágeno está más maduro, de modo que la estabilidad térmica aumenta. La estabilidad térmica es básicamente la resistencia de la molécula de proteína al despliegue como resultado de cualquier tratamiento térmico (Bernal y col., 1987).

Las fibrillas de colágeno se ejemplifican en la figura 4, las moléculas de colágeno están unidos entre sí por enlaces covalentes cruzados, y hay varios tipos de entrecruzamiento en el colágeno de pescado maduro (Bracho y Haard, 1990). Piridinolina es uno de los entrecruzamientos intermoleculares (Fujimoto y col., 1977) y se informó que existe una estrecha relación con la tensión física de colágeno (Horgan y col., 1990). El colágeno, que contiene una

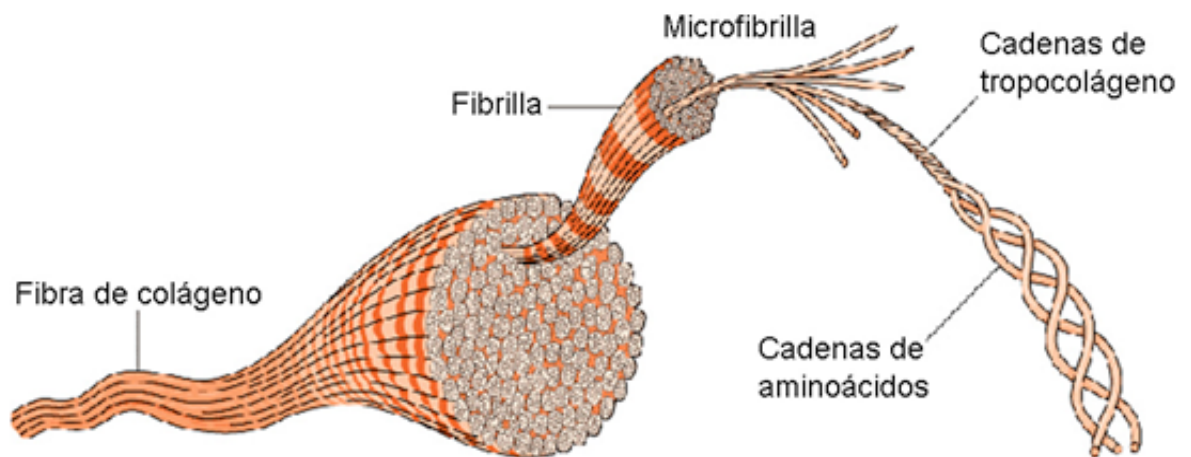


Figura 4. Esquema de una fibra de colágeno.

Fuente: Colágeno MD [<http://www.colagenomd.com/fibras-de-colageno/>].

alta cantidad de piridinolina, mostró una baja solubilidad en el tendón de ternera (Horgan y col., 1990), músculo bovino (Smith y Judge, 1991) y el músculo ovino (Young y col., 1994).

Por lo tanto, hay una posibilidad de que la piridinolina sea más abundante en el colágeno insoluble que en el colágeno soluble. Sin embargo, no hay informes sobre la relación entre el contenido de piridinolina y la solubilidad de colágeno del calamar al ser tratado térmicamente.

Los entrecruzamientos covalentes intermoleculares en el colágeno son responsables de la estabilidad, la fuerza física y las propiedades mecánicas del tejido conectivo. La agregación se inicia por la desaminación enzimática oxidativa de grupos aminos, específicamente de lisina (Lys) e hidroxilisina (Hyl) y los residuos peptídicos de lisil oxidasa (Gallop y col., 1972). Los aldehídos que se producen luego se condensan espontáneamente con grupos amino sobre los residuos peptídicos específicos de Lys e Hyl para formar enlaces cruzados intermoleculares disfuncionales reducibles. Los estudios detallados de entrecruzamiento de colágeno han demostrado que la mayoría de las fuentes contienen menos de uno por mil entrecruzamientos

de residuos de aminoácidos (Shapiro y col., 1979; Eyre, 1987). Estos estudios se han llevado a cabo en tejidos tales como tendón, ligamento, piel, placenta, hueso, cartílago, córnea, etc., en la que el colágeno es un componente principal.

Se ha encontrado una estrecha relación entre la firmeza muscular y el contenido de colágeno en pescados y organismos marinos (Ochiai y col., 1985; Sato y col., 1986; Hatae y col., 1986; Olaechea y col., 1993). En general, el tratamiento térmico del músculo gelatiniza colágeno en ella y debilita la integridad de las células musculares, lo que lleva al ablandamiento del músculo. El músculo de calamar también se suaviza después de la cocción (Otwell y Hamann, 1979; Stanley y Hultin 1982; Kolodziejska y col., 1987; Kugino 1994; Naito y col., 1996; Ando y col., 1996 y 1997). Se ha descrito que las causas principales para el ablandamiento del músculo de calamar cocido son la destrucción de las células musculares (Kugino y Kugino 1994) y / o la disminución de la integridad de la célula por gelatinización del colágeno (Ando y col., 1997 y 1998). El músculo de calamar cocido, diferente de otros músculos de peces, es relativamente duro y no es frágil durante el calentamiento. Por lo tanto, se supone que la estabilidad térmica de músculo de calamar cocido debe estar relacionada con la presencia de colágeno estable al calor.

Solubilidad del colágeno.

La solubilidad es una de las funciones más importantes del colágeno, y esta propiedad se requiere por lo general para aplicaciones prácticas de la proteína. El colágeno de pescado es relativamente soluble en una solución de ácido diluido, tal como ácido acético 0,5 M. Sin embargo, muchos colágenos de invertebrados son tan insolubles que la digestión limitada con proteasa se debe realizar para ponerlas en solución. Por lo tanto, la eficiencia de solubilización enzimática es un factor importante en la utilización de los colágenos de invertebrados. La pepsina de mucosa de estómago porcino ha sido aplicada principalmente para solubilizar los colágenos en los animales acuáticos, pero la información científica sobre la solubilización de estos colágenos por digestión limitada con otras proteasas es bastante escasa (Yoshinaka y col., 1990; Cui y col., 2007).

Por otra parte, hay muchas publicaciones sobre la solubilidad del colágeno en el músculo de calamar (Ando y col., 1999 y 2001; Borderías, 1985; Sato y col., 1991). Muchas de las propiedades funcionales del músculo de organismos marinos están relacionadas con la solubilidad de la proteína constituyente y se sabe que la solubilidad del colágeno en animales marinos es significativamente mayor que la de músculo de especies como bovinos, ovinos y

porcinos. Sin embargo, esta solubilidad disminuye durante su almacenamiento en congelación (Borderías y Montero, 1985). La solubilidad del colágeno del manto de calamar disminuye después de 16 meses a -20°C (Ruiz-Capillas y col., 2002). La disminución en la solubilidad del colágeno durante el almacenamiento congelado podría ser debido a la formación de ácido y cetaminas estables a enlaces térmicos (Bailey y Etherington, 1980). Durante el tratamiento térmico de manto de calamar, Ando y col. en 1999 y 2001 informaron que alrededor del 70 % de colágeno del manto de calamar no se solubilizó incluso después de 30 min de calentamiento en agua hirviendo. Además, las fibrillas de colágeno en el manto de calamar fueron claramente observadas bajo un microscopio electrónico, incluso después de la cocción. Se supone que la estabilidad térmica del músculo de calamar cocido está relacionada con la presencia de colágeno estable al calor (Ando y col., 2001).

Efecto del tratamiento pos captura del calamar

El calor presente en los animales recientemente muertos debe ser eliminado rápidamente para evitar la descomposición y detener las pérdidas de peso del cuerpo. El periodo requerido para eliminar este calor es menor de 24 horas (Norman, 1990). La congelación es importante para preservar la calidad de los alimentos y la textura. Entre más rápido se dé la congelación se generarán cristales de hielo más pequeños y se mantendrá la estructura celular. La congelación criogénica es la tecnología de congelación más rápida disponible, debido a la temperatura ultra baja del nitrógeno líquido (-196°C) (Da-Wen, 2001). También se conoce que tanto la actividad enzimática como la microbiana están altamente influenciadas por la temperatura. Sin embargo, en el rango de temperatura de 0 a 25°C , la actividad microbiana es relativamente más importante, y los cambios en la temperatura tienen mayor impacto en el crecimiento microbiano que en la actividad enzimática. Cuando el producto se ha congelado lentamente o cuando ha habido fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento, los cristales de hielo que se forman crecen extrayendo agua ligada a las proteínas, de tal forma que estas se desorganizan siendo luego incapaces de recuperar dicha agua durante la descongelación, de manera que esta agua al perderse arrastra los nutrientes hidrosolubles. Este proceso cambia la textura del alimento, produciendo un endurecimiento e incluso disminuyendo su solubilidad y valor nutritivo.

Incluso los aspectos bioquímicos del colágeno de calamares congelados han recibido poca atención. En algunos documentos sobre los filetes de pescado magros y manto de calamar se informa que en el tejido conectivo, el colágeno también puede ser desnaturalizado

durante el almacenamiento congelado (Badii y Howell, 2002; Ruiz-Capillas y col., 2002). Considerando que, muchos informes han sido publicados en calamares, indicando que la carne se reduce en aproximadamente un 30% y, en general, durante la aplicación de calor, el colágeno en el tejido conectivo se ha considerado que pueda afectar a la sensibilidad muscular (Ando y col., 1999 y 2001).

Por otro lado, el almacenamiento en hielo y la refrigeración son unas de las técnicas más ampliamente utilizadas para conservar la carne, ya que conserva el tejido muscular al retardar el crecimiento de los microorganismos y lentificar muchas reacciones químicas y enzimáticas (Fennema, 2000).

Por otra parte se ha demostrado una actividad enzimática endógena en el manto de varias especies de calamar. Esta actividad proteolítica promueve pérdida de la textura y funcionalidad de las proteínas durante el almacenamiento o procesamiento (Ayensa y col. 2002; Gómez-Guillén y col. 2002; Ruiz-Capillas y col., 2003). Varias enzimas (carboxilasa, aminopeptidasa, la tripsina, enzimas quimotripsina, etc.) se encuentran en el músculo de calamar gigante y fluctúan con la temporada o la edad del calamar (Ezquerria-Brauer y col. 2002). Las pobres propiedades funcionales causadas por la actividad proteolítica endógena han restringido la utilidad del calamar gigante como ingrediente alimentario (Gómez-Guillén y col. 2003). Si no se controla la actividad enzimática, la mayoría de las proteínas en los tejidos musculares se degradan a pequeños péptidos que no tienen las propiedades funcionales necesarias para ser útiles como ingredientes alimentarios.

Los resultados de un estudio mostraron que el manejo adecuado del calamar gigante específicamente del manto, durante las diferentes etapas de postcaptura (es decir, la evisceración, almacenamiento en frío y transporte) ayudan a mantener la integridad de las proteínas musculares y la funcionalidad, así como también se vio reducida casi completamente la alta actividad proteolítica propuesta en otros estudios de estos especímenes, al menos por 15 días. Con el uso de este método de conservación, el músculo de calamar podría ser una buena materia prima para su uso en productos de valor añadido, como los productos gelificados. Si el músculo de calamar se va a utilizar como materia prima, es recomendable tener en cuenta factores como la temporada de pesca, estado fisiológico, almacenamiento en frío y transporte de calamar gigante, ya que estos factores tienen un marcado efecto sobre las características del producto.

Debido a lo anterior, realizamos un estudio para evaluar los cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo del calamar gigante durante un periodo de almacenamiento en hielo para obtener información útil acerca de las modificaciones que ocurren en el músculo

debido a este método de conservación. Se ha estudiado anteriormente el efecto del almacenamiento en hielo exclusivamente en el manto de *Dosidicus gigas*, en donde se tenía como objetivo generar información y estudiar aspectos químicos (actividad proteolítica) y físicos (pH, textura, calorimetría diferencial de barrido, peso y talla de cada porción analizada) de 5 mantos almacenados en hielo en distintos tiempos (Ramirez-Olivaz, 2004). Pero en dicha investigación se centraron particularmente en los cambios que ocurrieron en las proteínas miofibrilares del musculo de manto, por lo que en este trabajo se decidió investigar solo los cambios que ocurren en las proteínas del tejido conectivo y la repercusión que tienen estos cambios estructurales en el musculo de aleta, manto y tentáculo del calamar gigante.

Debido a que los desechos al procesar calamar y animales marinos, representan hasta un 60 % del peso de la captura total y tales desechos pueden ser utilizados para obtener subproductos como el colágeno, en donde casi todo el producto desechado es tejido conectivo el cual contiene alto porcentaje en colágeno.

HIPÓTESIS

El almacenamiento en hielo del calamar gigante provocará un aumento en la resistencia térmica y disminución en la solubilidad de las proteínas del tejido conectivo extraído de su músculo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios estructurales en las proteínas del tejido conectivo del manto, aletas y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los cambios en solubilidad y resistencia térmica de las proteínas del tejido conectivo de manto, aletas y tentáculos de calamar gigante durante su almacenamiento en hielo.
- Evaluar los cambios en textura del músculo de manto, aletas y tentáculos de calamar gigante durante su almacenamiento en hielo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la materia prima

Se utilizó músculo de especímenes jóvenes de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (25-30 cm y 3-3.5 kg), los cuales fueron capturados en las costas de Bahía de Kino, Sonora. Los organismos eviscerados se transportaron en hielo al laboratorio de productos marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, donde inmediatamente se llevó a cabo el faenado, separando las aletas, manto y tentáculos, los cuales fueron almacenados en hielo durante 20 días, con muestreos cada 5 días para realizar los análisis físicos y químicos correspondientes.

Extracción de las diferentes fracciones del tejido conectivo

La extracción del tejido conectivo se desarrolló de acuerdo a la metodología descrita por Sivakumar y Chandrakasan (1998) con ligeras modificaciones. Todo el proceso de extracción se llevó a cabo a 4 °C. El músculo fresco de las 3 regiones anatómicas (manto, aletas y tentáculos) del calamar gigante fueron mezcladas y homogenizadas por 24 h con una solución de urea 6 M conteniendo acetato de sodio 0.5 M (pH 6.8) con la finalidad de remover las proteínas miofibrilares y proteoglicanos. Después de la centrifugación a 10,000 xg por 40 min, el residuo insoluble fue secuencialmente extraído con un buffer neutro (Tris/ 1M NaCl 0.05 M, pH 7.2) (tejido conectivo soluble en sal neutra) y pepsina (10 mg/g de tejido en ácido acético, CH₃COOH 0.5 M) (tejido conectivo soluble en pepsina, TCSP). El remanente final se consideró como colágeno insoluble (CI). Las soluciones de colágeno extraídas se precipitaron con cloruro de sodio (NaCl) hasta una concentración final de 2 M y colectadas por centrifugación (10,000 xg durante 40 min). Los precipitados fueron redissueltos en ácido acético 0.5 M y dializados contra fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 0.02 M (pH 8.6) en membrana de celulosa de 10 kDa a 4 °C. El precipitado fue redissuelto en la misma solución de ácido acético y dializado con ácido acético 0.05 M para finalmente ser liofilizado.

Análisis de proteínas

La concentración de proteína cruda en los extractos obtenidos se determinó mediante el método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2005). Se pesaron 0.2 g de cada una de las muestras en un

matraz de micro-Kjeldahl, 2.5 mL de H₂SO₄, y aproximadamente 1.0 g de mezcla catalizadora para someterse a digestión bajo una campana de extracción. La digestión terminó cuando el color de la muestra se tornó azul-verde claro y se procedió a enfriar el matraz durante 4 minutos para después añadirle 7 mL de agua. Se encendió y preparó la unidad destiladora para añadirle la muestra a la cámara de ebullición por medio de un embudo y se enjuagó el matraz con aproximadamente 5 mL de H₂O destilada. Se utilizó un matraz Erlenmeyer con 10 mL de ácido bórico y dos gotas de indicador para recolectar el destilado. Finalmente se añadieron 10 mL de la solución de NaOH a la cámara de ebullición y el destilado estuvo listo para ser titulado cuando se tornó verde en el matraz receptor. La muestra se tituló con 0.1 N de HCl y un color violeta indicó el punto final de la titulación.

Electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida

La pureza de las soluciones de colágeno fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (dodecil sulfato de sodio – SDS-PAGE por sus siglas en inglés) basándose en el método de Laemmli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 7.5%, y se inyectaron 5 µg de muestra. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y se destiñeron en una solución de metanol: agua: ácido acético (5:4:1, v/v/v).

Calorimetría diferencial de barrido

El comportamiento térmico del colágeno extraído del músculo de calamar gigante fue estudiado por medio de calorimetría de barrido diferencial de 10 a 150 °C. La temperatura de transición y entalpía fueron medidas usando un sistema de análisis térmico 1020 serie DSC7 (Perkin Elmer, Norwalk, CN). La evaluación de las señales se realizó con computadora utilizando un equipo Perkin Elmer Nelson modelo 1022. Las muestras (20-30 mg) se colocaron en cápsulas herméticas CDB (Perkin Elmer no. 0319-0218) y la prueba fue realizada con un flujo de calor de 10 °C/min. Una cápsula vacía se utilizó como referencia (Ramírez-Olivas y col., 2004).

Composición de aminoácidos

El contenido de aminoácidos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un sistema de HPLC

serie 1200 de Hewlett-Packard (Waldbronn, Alemania) (Vázquez-Ortiz y col., 1997), el cual fue realizado en el centro de investigación en alimentación y desarrollo (CIAD) de Hermosillo, Sonora. Brevemente, las muestras se hidrolizaron usando HCl 6 M en un evaporador por 6 horas en tubos sellados a 150 ° C. Los hidrolizados se diluyeron con un buffer de borato de sodio 0.4 M ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), derivatizado con *o*-ftalaldehído (OPA) para la determinación de los aminoácidos primarios y derivatizado con 9-fluorenilmetil cloroformiato (Fmoc) para la determinación de los aminoácidos secundarios. Se registraron los cromatogramas y las integraciones se calcularon utilizando software ChemStation (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). La emisión de fluorescencia se controló continuamente a 330 y 418 nm.

Perfil de textura

La textura fue medida registrando la fuerza requerida para cortar el músculo de calamar (1 cm x 1 cm x 1 cm) utilizando un texturómetro Plus TA-XT2 (Food Technology Corp., Sterling, VA, EE.UU.) con una cuchilla en forma de V (Warner Bratzler cizallamiento por compresión de carne) unido a una prensa capaz de aplicar 100 N de carga y una velocidad de cruceta de 200 mm min⁻¹.

Análisis estadístico

El diseño estadístico del presente estudio fue planeado para reducir la variación entre replicas. El contenido de colágeno y análisis calorimétrico fue basado en un promedio de tres repeticiones. Los datos fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANOVA) donde las diferencias fueron establecidas por medio de una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Finalmente, los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico JMP versión 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción de las diferentes fracciones de tejido conectivo

A partir del músculo de las tres regiones anatómicas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y con la utilización de urea 6 M en un buffer de acetato de sodio (0,5 M; pH de 6,8) se logró solubilizar la fracción de proteínas miofibrilares y por consiguiente obtener una precipitación del tejido conectivo, del cual, por cada 100 g de músculo fueron obtenidos: 3.11 g de tejido para la región de las aletas, 1.61 g para el manto y 4.98 g para los tentáculos (Tabla 1). Se encontró en la región de los tentáculos una mayor cantidad de proteínas del tejido conectivo con respecto a las otras dos regiones, de las cuales las aletas ocuparon el segundo lugar y el manto ocupó el último con una menor cantidad de tejido conectivo precipitado. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Torres-Arreola y col. en 2008, quienes reportaron que el contenido de tejido conectivo extraído de tentáculos fue 3-4 veces mayor que el extraído de aletas y manto. Sin embargo, estos autores obtuvieron un mayor contenido de tejido conectivo (7-28 g/100 g de músculo) en comparación con este estudio, lo cual pueda deberse al diferente tamaño y edad de los calamares empleados en dicho trabajo (45-50 cm, 5-6 Kg), debido a que se ha informado que la edad y el tamaño de los organismos marinos podrían influir en el contenido de tejido conectivo y colágeno en su músculo (Ando y col., 2006).

Por otra parte, en estudios llevados a cabo en otras especies de calamar como *Loligo patagonica*, *Illex argentinus* y *Tadoropsis eblanae* se ha detectado un contenido de tejido conectivo entre el 3 y 18 % en las diferentes regiones anatómicas (Sikorski y Borderias, 1994; Morales y col., 2000). Si bien, en este estudio se obtuvo entre 1.6-4.9 % aproximadamente de tejido conectivo dependiendo de la región anatómica, lo cual se encuentra en rangos bajos en comparación con las investigaciones antes mencionadas, la variabilidad en los valores encontrados se sustenta en que dependiendo de las funciones que desempeña el organismo y considerando que los cefalópodos son especies de crecimiento rápido, implica un alto grado de reemplazo o recambio proteico y por lo tanto puede presentarse variabilidad en el contenido de tejido conectivo en el músculo (Sikorski y Borderias, 1994; Morales et al., 2000).

Durante el aislamiento parcial de tejido conectivo de las tres regiones anatómicas del calamar gigante, se obtuvieron tres fracciones en base a sus características de solubilidad. Se obtuvo una fracción de tejido conectivo soluble en sal neutra (TCSS) y una fracción donde se utilizó pepsina (10 mg/g de tejido en ácido acético 0.5 M) tejido conectivo soluble en pepsina

Tabla 1. Contenido y distribución de tejido conectivo, fracción insoluble del tejido conectivo, hidroxiprolina y colágeno insoluble extraído de calmar gigante (*Dosidicus gigas*).

Los resultados representan un promedio de 3 determinaciones.

*El contenido de proteínas fue calculado por el método de Micro Kjeldahl.

**El contenido de colágeno insoluble fue obtenido multiplicando el contenido de hidroxiprolina por el factor 21.56.

Región	*Tejido	*Fracción	g de	**Colágeno
Anatómica	conectivo	insoluble del	Hidroxiprolina	insoluble CI
	(g/100 g de	tejido	en la fracción	(g/100 g de
	músculo)	conectivo	insoluble	musculo)
		(g/100 g de		
		músculo)		
Aleta	3.11 ± 0.24	0.93 ± 0.08	0.039 ± 0.004	0.84 ± 0.09
Manto	1.61 ± 0.25	0.49 ± 0.06	0.020 ± 0.002	0.43 ± 0.04
Tentáculo	4.98 ± 0.53	1.30 ± 0.09	0.056 ± 0.004	1.21 ± 0.09

(TCSP). Después de realizar todas las precipitaciones al tejido conectivo, fue obtenido un remanente final considerado la fracción insoluble (TCI), de la cual por cada 100 g de músculo se obtuvieron 0.93 g, 0.49 g y 1.30 g de aleta, manto y tentáculo respectivamente.

Estos resultados muestran que igual como en el caso del tejido conectivo, los tentáculos mostraron el mayor contenido de la fracción insoluble (TCI) (mayoritariamente colágeno), siendo manto la región anatómica con el valor más bajo de TCI (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, los cuales atribuyen un mayor grado de entrecruzamiento y, por lo tanto, baja solubilidad en las fibras de colágeno para regiones anatómicas, como aletas y tentáculos debido a sus funciones específicas durante mecanismos natatorios (Sikorski y Borderias, 1994; Torres-Arreola y col., 2008). Sin embargo, la relación de TCI con el contenido total de tejido conectivo de las tres regiones anatómicas fue similar ($p \geq 0.05$), lo que indica que la solubilidad de las proteínas del tejido conectivo en músculo de calamar fresco es independiente de la región anatómica evaluada.

Finalmente en la Tabla 1, como un agregado para este trabajo se decidió cuantificar la cantidad de colágeno presente en nuestro precipitado de tejido conectivo para confirmar que realmente se trabajó con dicha proteína. Para esto se cuantificaron los valores de hidroxiprolina, los cuales fueron 0.039 g para aleta, 0.020 para manto y 0.056 para tentáculo. A partir de los valores de hidroxiprolina se pudo obtener el contenido de colágeno insoluble multiplicando el contenido de hidroxiprolina por un factor de valor de 21.56, el cual es un factor reportado para cefalópodos. Los resultados fueron que por cada 100 g de músculo se obtuvo 0.84 g, 0.43 g y 1.21 g para aleta, manto y tentáculo, respectivamente. Lo anterior representa una concentración de colágeno en la fracción insoluble de alrededor del 90%, lo cual confirma que la principal proteína presente en el tejido conectivo de músculo de calamar gigante corresponde al colágeno.

Cambios en la solubilidad del tejido conectivo

Mientras que la concentración en el tejido conectivo no cambió durante el almacenamiento en hielo (datos no mostrados), sus fracciones extraídas muestran cambios en la solubilidad (Figura 5). Alrededor de 25-30 % del tejido conectivo extraído de músculo fresco de las aletas, manto y tentáculos corresponde a TCI, esta proporción alcanzó valores superiores a 60% después del día 15 de almacenamiento en hielo, siendo las aletas la región anatómica con el más alto grado de TCI ($p < 0,05$). Lo cual concuerda con lo encontrado por Ramirez-Suarez y col. (2008) quienes observaron en general una ligera disminución en la solubilidad de las proteínas del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) a lo largo de 15 días de almacenamiento en hielo. En otras palabras, las proteínas del tejido conectivo en el músculo de calamar gigante tiende a perder solubilidad durante los primeros 15 días de almacenamiento en hielo, posiblemente debido a entrecruzamientos intra e intermoleculares, en gran parte derivada por la desaminación oxidativa de los residuos de lisina e hidroxilisina, que por un mecanismo enzimático que implica lisil oxidasa produce enlaces covalentes en las regiones terminales (telopéptidos) de las fibras de colágeno (Kagan et al, 1986;. Bailey, Paul Knott, 1998; Matmaroh et al, 2011).

En los tentáculos, este comportamiento se observó incluso después de 20 días de almacenamiento en hielo, alcanzando valores mayores al 70% de TCI, mientras que para las aletas y el manto, el TCI disminuyó después del mismo período ($p < 0,05$). Esto se relaciona con los datos reportados por Suárez y col. (2005), donde se reportó una disminución de la fracción insoluble de colágeno durante el almacenamiento en hielo de pez besugo (*Sparus aurata*).

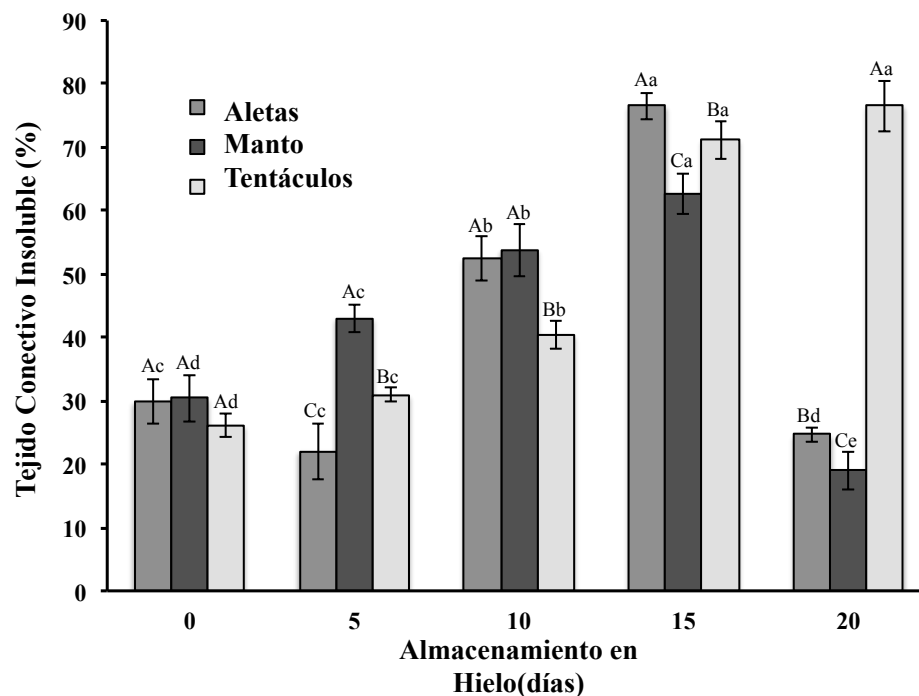


Figura 5. Gráfico que muestra la solubilidad del tejido conectivo del músculo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo. Donde el eje X representa los días de almacenamiento en hielo y el eje Y el porcentaje de TCI. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre regiones anatómicas, letras minúsculas diferentes significan diferencias significativas con respecto al tiempo de almacenamiento.

Sin embargo, esta disminución se presentó después de un período de tiempo más corto, probablemente debido a diferencias en la actividad de enzimas endógenas de cada especie.

Estas enzimas proteolíticas, además de afectar a las proteínas miofibrilares en el músculo, podrían hidrolizar proteínas del tejido conectivo, ya que varios estudios han informado que el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) tiene una alta actividad proteolítica durante su manipulación post-mortem. (Gómez-Guillén, Solas, Borderías, y Montero, 1996; Gómez-Guillén y Montero, 1997; Gómez-Guillén, Montero, Solas, y Borderías, 1998). Ramírez-Olivas y col. (2004) informaron de un aumento significativo en la actividad proteolítica total de músculo de calamar gigante después de 9 días de almacenamiento en hielo, con disminuciones

significativas después de 15 días, lo que afecta la estabilidad de proteínas en el músculo. Basado en esto, se ha informado de metaloproteasas que tienen actividad en las fibras de colágeno (Miura-Yokota et al., 2004), las cuales podrían ser responsables de los cambios de solubilidad en el tejido conectivo durante las etapas posteriores de almacenamiento en hielo de músculo de calamar gigante.

Evaluación del peso molecular

La degradación o la agregación de las proteínas en el tejido conectivo del músculo de calamar gigante, como consecuencia de los cambios *post-mortem* han sido supervisadas por SDS-PAGE. En la figura 6 se observan los distintos patrones electroforéticos de los extractos de colágeno a lo largo de 20 días de almacenamiento en hielo. Las imágenes a, b y c corresponden a las electroforesis de tejido conectivo soluble en sal (TCSS) de aleta, manto y tentáculo respectivamente, mientras que las imágenes d, e y f son las correspondientes a las de tejido conectivo soluble en pepsina (TCSP) de aleta, manto y tentáculo respectivamente. En la electroforesis de TCSS de aleta se observan bandas de un peso de entre 60 y 66 kDa en el día 0, 5 y 10 muy marcadas. Mientras que en los días 15 y 20 se notan muy tenues, las cuales podrían pertenecer a la proteína elastina que tiene un peso entre 70 kDa y es un componente del tejido conectivo (Xiong, 1997; Kim y Park, 2005). En los días 15 y 20 de almacenamiento se llegan a observar bandas entre los 97 y 116 kDa que probablemente se deban a colágeno.

Estos resultados sustentan lo reportado por otros autores, quienes obtuvieron una molécula de colágeno con tres cadenas α de un peso molecular inferior a los 100 kDa (Sugiyama et al. 1989; Sirkoski y Borderias, 1994; Badii y Howell, 2003). En la imagen de TCSS de manto se observan distintas bandas para diferentes pesos a lo largo de los 20 días de almacenamiento en hielo, de las cuales destacan las bandas muy marcadas a los 97 kDa y también se llegan a observar bandas de 200 kDa, las cuales podrían deberse a diferentes cadenas de colágeno, en caso de la banda de 97 kDa se podría deber a las cadenas α 1, mientras que la banda de 200 kDa a una cadena beta. En la imagen de TCSS de tentáculo se observan dos bandas muy próximas a los 97 kDa en los días 15 y 20, a diferencia de lo observado en los días 15 y 20 de aletas y manto TCSS donde solo se logra observar una banda grande y bien marcada. Lo anterior sugiere que en los tentáculos existe la presencia de dos cadenas proteicas (α 1 y α 2), a diferencia de las anteriores (manto y aleta) donde se observa una sola cadena probablemente α idéntica para cada región.

En los patrones electroforéticos del TCSP observamos las mismas bandas marcadas en 97 kDa a lo largo de los 20 días de almacenamiento en hielo que encontramos en el TCSS pero en este caso se logran apreciar más claramente bandas a la altura de 200 y 205 kDa. Si bien es

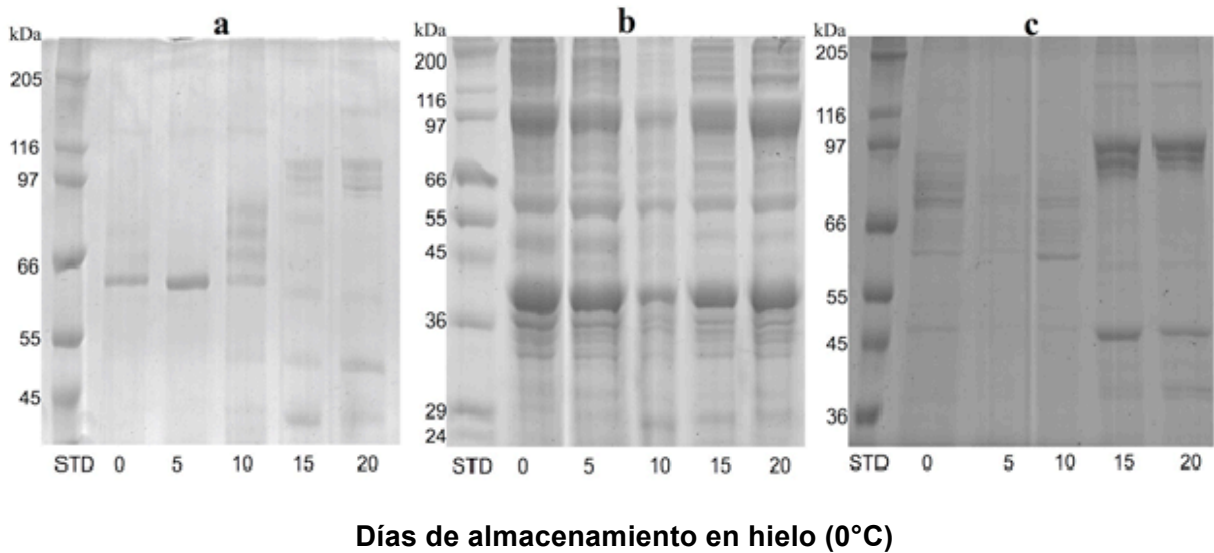
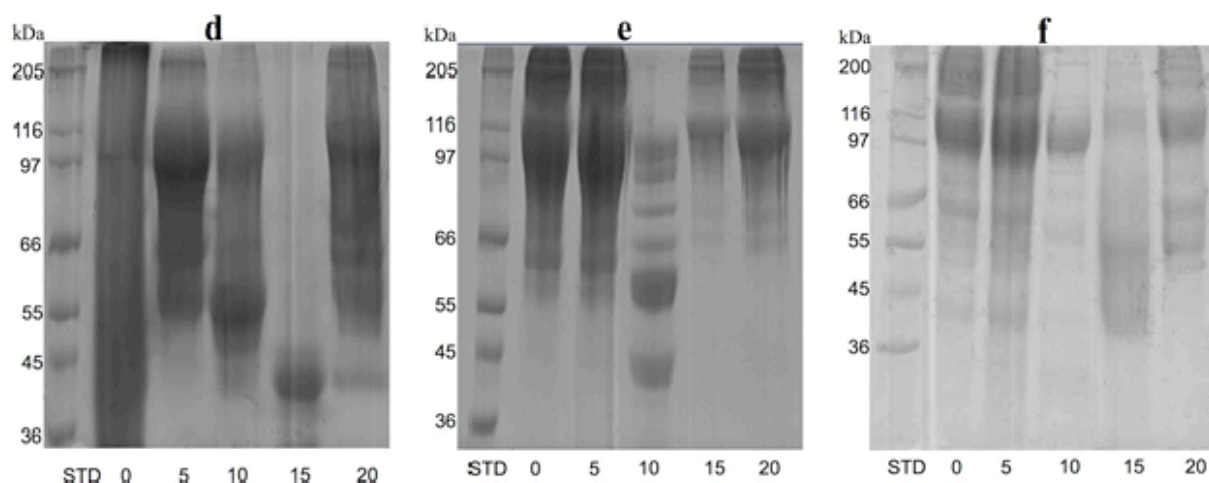


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del tejido conectivo extraído de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) realizados a lo largo de 20 días. Imagen (a): Tejido conectivo soluble en sal de aleta, (b) tejido conectivo soluble en sal de manto, (c) tejido conectivo soluble en sal de tentáculo. STD: marcador de peso molecular.

cierto que el colágeno está constituido por tres cadenas polipeptídicas (α) con pesos moleculares cercanos a los 100 kDa (Sirkoski y Borderias, 1994; Badii y Howell, 2003), también se ha reportado por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que dos de éstas cadenas α pueden estar unidas entre sí por medio de entrecruzamientos intramoleculares para formar lo que se conoce como una cadena β (Kimura y Ohno, 1987; Giraud y col., 2000; Nagai y col., 2001; Mizuta y col., 2002).

Por todo esto, la banda obtenida a partir del TCSP puede ser atribuida a una cadena β . Se pueden apreciar diferencias entre el TCSS con respecto al TCSP, al realizar la comparación mediante el perfil electroforético (Figura 6), donde se aprecian claras diferencias en cuanto al peso molecular de las bandas obtenidas. Las fracciones proteicas de colágeno extraídas de las tres regiones anatómicas a partir de una solución con pepsina presentaron un peso molecular alrededor de los 200-205 kDa. Es importante mencionar que la aparición de las cadenas α en el TCSS y de las cadenas β en el TCSP concuerda con lo reportado por varios autores donde se informa que la sal (NaCl) presenta la menor capacidad de solubilizar al colágeno puro debido a

la alta fuerza iónica del medio y permite solubilizar parte del colágeno. Es decir, las cadenas α y β sin entrecruzamiento intra e intermolecular. Además, este solvente es capaz de solubilizar



Días de almacenamiento en hielo (0°C)

Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) del tejido conectivo extraído de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) realizados a lo largo de 20 días. Imagen (d) tejido conectivo soluble en pepsina de aleta, (e) tejido conectivo soluble en pepsina de manto y (f) tejido conectivo soluble en pepsina de tentáculo. STD: marcador de peso molecular.

componentes miofibrilares de bajo peso molecular remanentes después de su extracción con urea afectando así la pureza de su extracción (Miller y Rhodes, 1982; Friess, 1998). Mientras que, el uso de pepsina como solvente radica principalmente en la habilidad de degradar aquellas porciones de moléculas de colágeno a partir de las cuales se originan los entrecruzamientos (Miller y Rhodes, 1982; Jongjareonrak et al., 2005). Es por esto que las bandas encontradas en el TCSP presentan pesos moleculares muy superiores a los encontrados para el TCSS. La diferencia en la capacidad de solubilizar de la sal y la pepsina podría explicar la presencia de bandas con peso molecular inferior a los 50 kDa en el TCSS de las tres regiones anatómicas evaluadas en este estudio. Sin embargo este trabajo no tiene como propósito purificar las proteínas, por lo que en este trabajo no se evaluaron las demás bandas.

El desvanecimiento o disminución de la intensidad de las bandas durante el almacenamiento en hielo podrían reflejar en algunos casos, la agregación y en otros la desnaturalización de las proteínas del tejido conectivo por la actividad de lisil oxidasa y de

metaloproteinasas respectivamente, durante el almacenamiento (Torres-Arreola, 2012; Miura-Yakota y col., 2004). La actividad lisil oxidasa (LOX) en el tejido conectivo de animales vertebrados marinos puede causar entrecruzamiento de sus fibras, induciendo la agregación de proteínas (Kagan y Li, 2003; Reynaud y col., 2008). Por otro lado, la proteólisis enzimática del músculo de calamar durante el almacenamiento en hielo induce la ruptura de las proteínas musculares (Ramirez-Olivas y col., 2004; Özoğul y col., 2011). Sin embargo, en este estudio, aunque se observó un cambio importante en los perfiles de proteínas, en general, no era posible establecer si predomina la agregación o desnaturalización de las proteínas del tejido conectivo durante el almacenamiento en hielo del músculo de calamar.

Resistencia térmica

La calorimetría diferencial de barrido fue utilizada para poder evaluar la desnaturalización de las proteínas del tejido conectivo de las tres regiones anatómicas del calamar durante su almacenamiento en hielo. Es una técnica útil que permite establecer la estabilidad térmica de una molécula, a mayor temperatura de transición indica una molécula más resistente. Las fracciones de tejido conectivo soluble en sal (TCSS), tejido conectivo soluble en pepsina (TCSP) e insoluble (TCI) de cada día durante su almacenamiento en hielo, fueron sometidas a un análisis de calorimetría diferencial de barrido, con la finalidad de elucidar la resistencia térmica de los extractos proteicos. En términos generales, todos los termogramas obtenidos tienen un mismo patrón de comportamiento, comienzan con un pico endotérmico a los 20 °C y culminan siempre en forma descendida a los 150 °C, además de mostrar otro pico térmico variable entre los 60-90 °C dependiendo de la fracción en base a su solubilidad y la región anatómica.

En los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (CDB) de TCSS extraídos de músculo fresco de aleta, manto y tentáculos se observó una transición exotérmica a 45.92, 43.45 y 58.10 °C, respectivamente, sin diferencias significativas en entalpía (55-62 J/g) entre aleta y el manto ($p \geq 0.05$), mientras que para los tentáculos fue de 83.1 J / g ($p < 0.05$). En las aletas y los tentáculos, la temperatura de desnaturalización se mantuvo durante los 20 días de almacenamiento en hielo. Por otro lado, TCSS del manto mostró un comportamiento diferente durante el mismo período, se observó un aumento en la temperatura de desnaturalización ($p < 0.05$), alcanzando un valor máximo a los 10 días de almacenamiento en hielo (104.97 °C), disminuyendo después a los 15 (84.10 °C) y 20 días (62.82 °C). Lo anterior podría estar relacionado con el aumento de la dureza del músculo durante el almacenamiento en hielo del

manto. De esta manera, Ramirez-Olivas y col. (2004) reportaron una resistencia máxima al corte de la capa obtenida a partir de organismos adultos de calamar gigante almacenados en hielo durante tres días, mientras que después de este período, la resistencia al corte disminuyó significativamente. Sin embargo, tal aumento viene en un período corto de tiempo que la

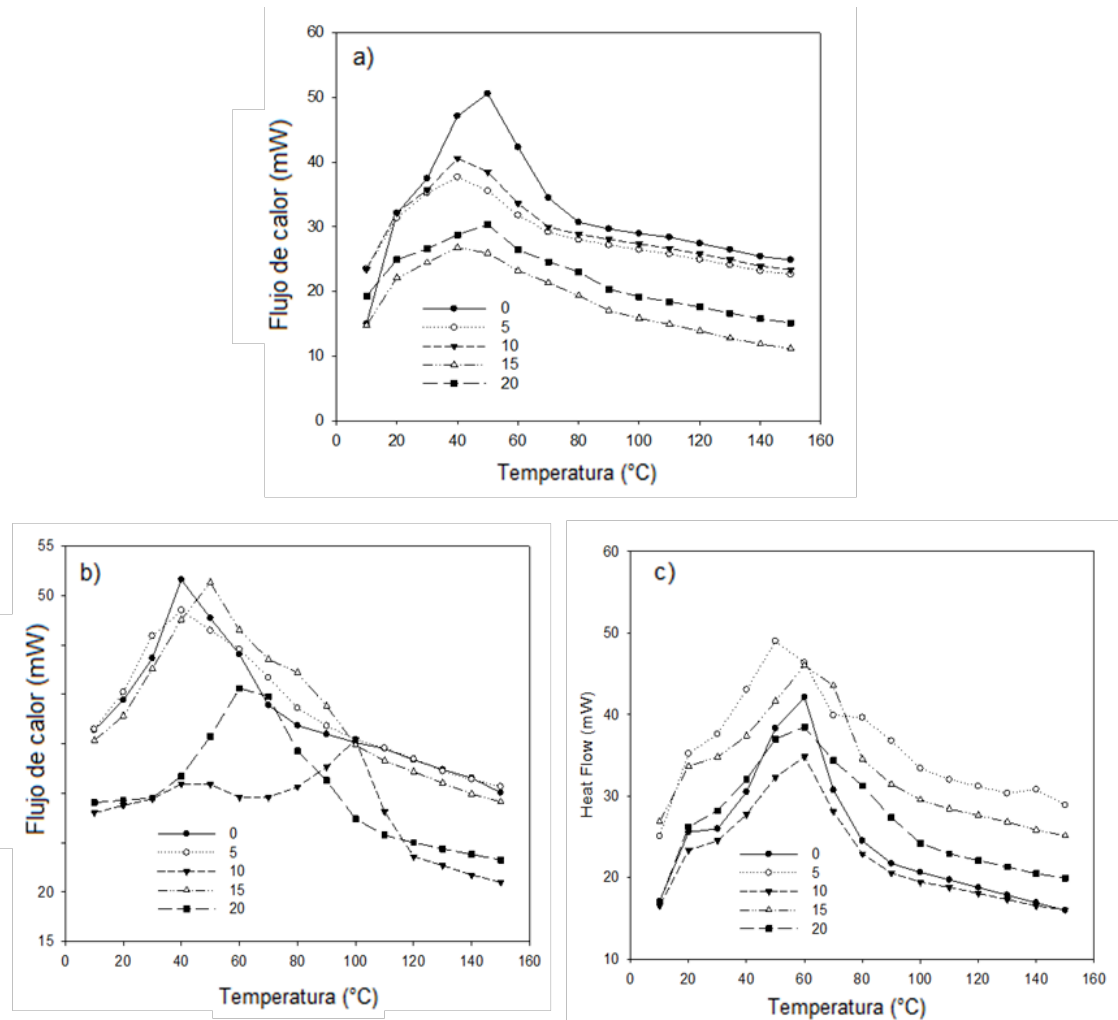


Figura 8. Termogramas del tejido conectivo soluble en sal (TCSS) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo.

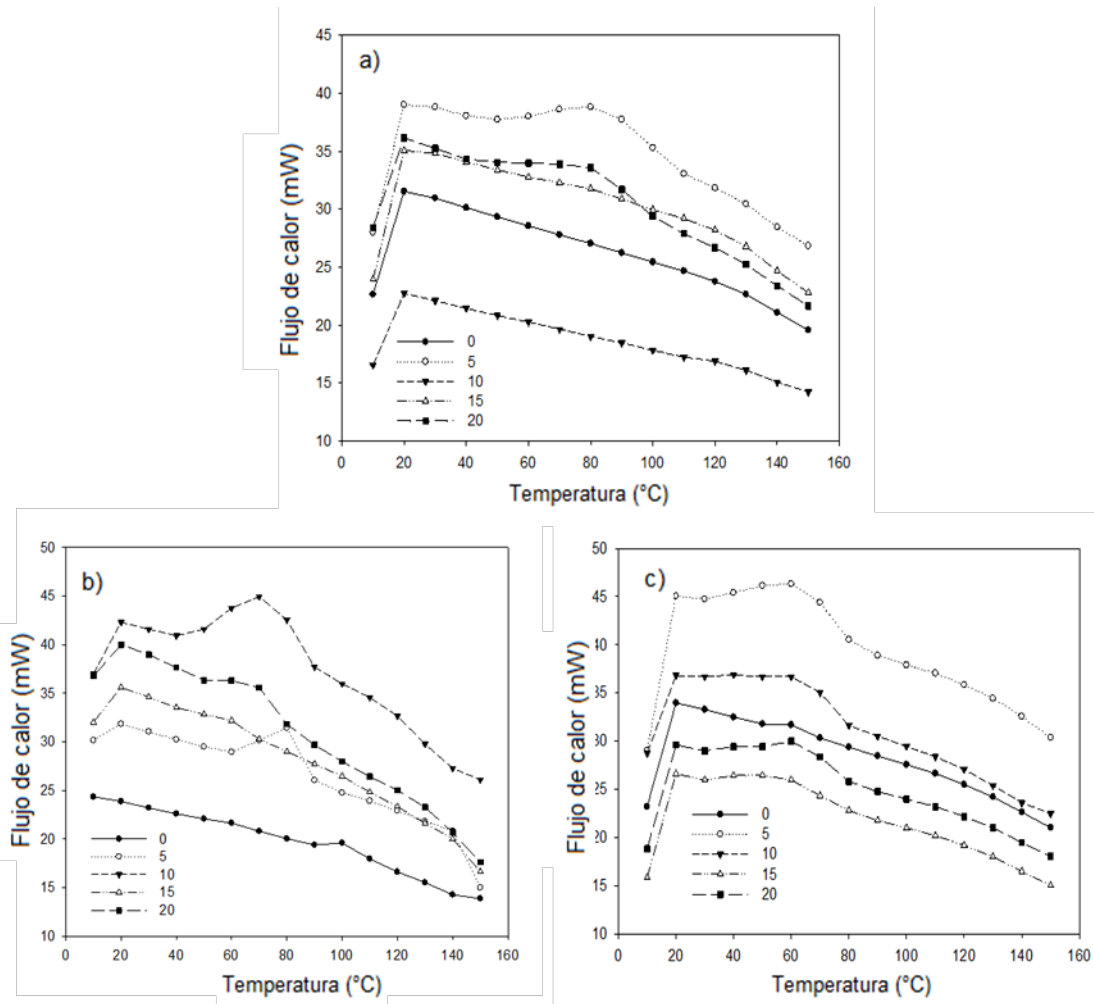


Figura 9. Termogramas del tejido conectivo soluble en pepsina (TCSP) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo.

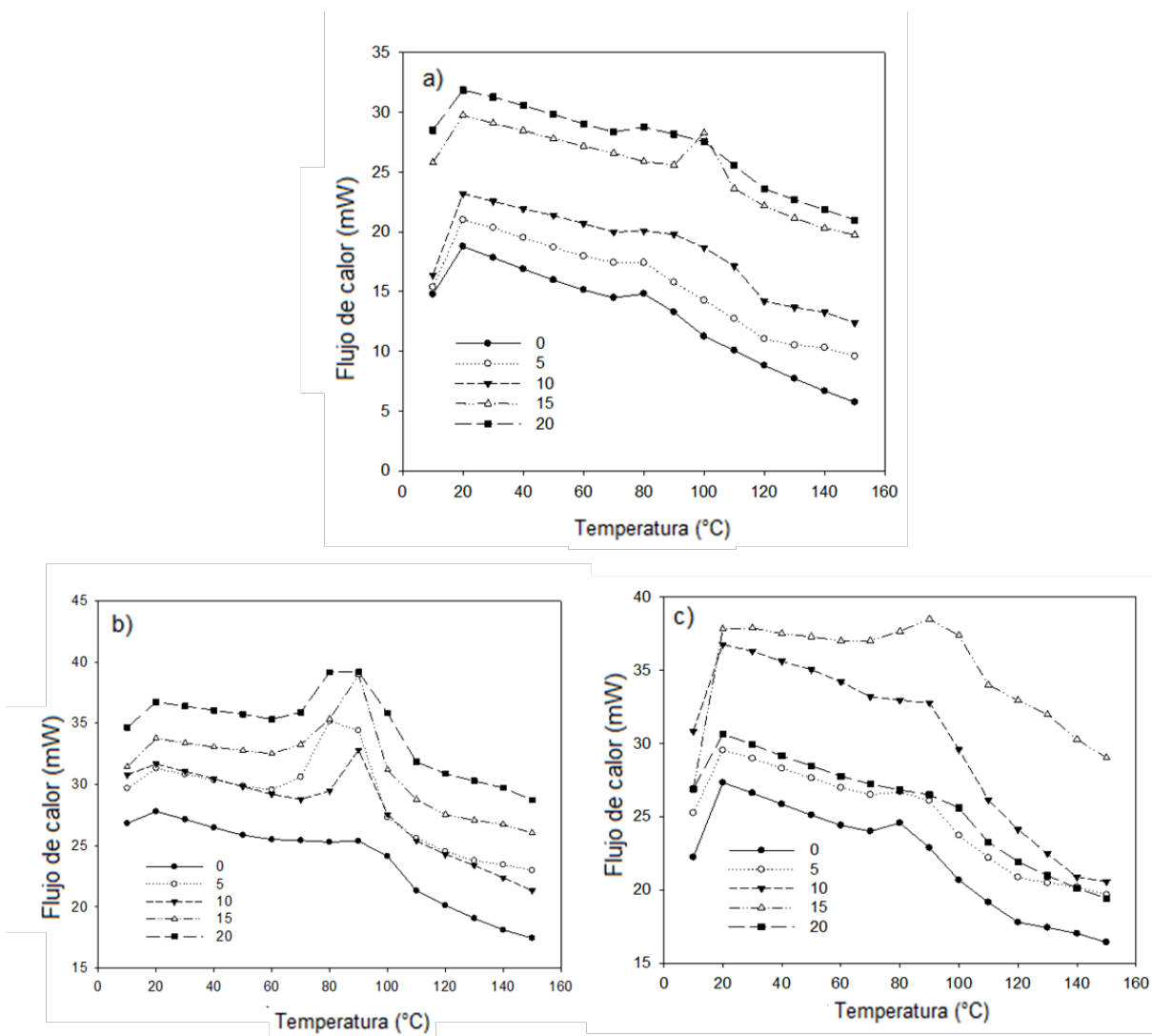


Figura 10. Termogramas del tejido conectivo insoluble (TCI) extraído del músculo de a) aleta, b) manto y c) tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo

temperatura más alta de desnaturalización alcanzada en este trabajo por TCSS, probablemente debido a la edad y el tamaño de los organismos evaluados, ya que la concentración de colágeno en el músculo depende de varios factores tales como la edad y el tamaño (Sirkosky y Borderias, 1994).

Para TCSP, no se encontraron diferencias contra el tiempo de almacenamiento en hielo (20 días) para cualquiera de las regiones anatómicas evaluados, ya sea para la transición térmica ni para entalpía ($p \geq 0.05$).

Sin embargo, los datos de temperatura de desnaturalización fueron significativamente mayores en las aletas (80-85 °C) que en el manto (60-68 °C) y los tentáculos (57-63 °C). Estos valores fueron más bajos que los reportados para TCSP extraído de calamar gigante (45- 50 cm y 6.5 kg), donde se encontró una temperatura de desnaturalización superior a 100 °C, probablemente debido al alto grado de entrecruzamiento en sus fibras de colágeno (Torres-Arreola y col., 2008). En otras especies marinas, como el salmón (*Salmo salar*), el bacalao (*Gadus morhua*) o pez globo ocellate (*Takifuga rubripes*) la temperatura de desnaturalización de TCSP no llega a 50 °C (Nagai y col., 2002; Badi y Howell, 2003; Gómez -Guillen y col., 2012).

Esto significa que incluso cuando TCSP obtenido en este estudio tienen menor temperatura de desnaturalización que los reportados para el mismo organismo, sigue siendo más alta que la reportada para otras especies marinas.

Finalmente, temperatura de desnaturalización de TCI (82 a 90 °C) fue mayor que TCSS y TCSP en el músculo fresco de todas las regiones anatómicas. Sin embargo, en las aletas y tentáculos, estos valores aumentaron a 96-102 °C después de 20 días de almacenamiento en hielo ($p < 0.05$), mientras que en el manto permaneció sin cambios durante el mismo período ($p \geq 0.05$).

Lo anterior podría estar relacionado con algún mecanismo de entrecruzamiento del colágeno durante la manipulación posterior a la pesca del calamar gigante, probablemente debido a la actividad lisil oxidasa. Esta es una amino oxidasa que entrecruza el colágeno y la elastina en el músculo, por lo cual hay aumento de la fuerza de corte de las fibrillas (Kagan y col., 1986;. Smith-Mungo y Kagan, 1998;. Torres-Arreola y col., 2012). Por lo tanto, debido a que se espera que la enzima pueda estar activa durante el almacenamiento en hielo en el calamar gigante, es necesario cuantificar su actividad durante este período de tiempo.

Composición de aminoácidos

El perfil de aminoácidos y su concentración se determinó en TCSS, TCSP y TCI extraídos de músculo de calamar gigante fresco (aleta, manto y brazos) (Tabla 2). No se encontraron diferencias en los perfiles de aminoácidos de las tres regiones anatómicas ($p \geq 0.05$), mientras que el método de extracción, muestra diferencias en la concentración de la mayoría de los aminoácidos característicos como la glicina (Gly), prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp), cisteína (cys) y lisina (Lys).

Los resultados muestran a Gly y Pro como los aminoácidos más abundantes en la pepsina y proteínas insolubles del tejido conectivo de las tres regiones anatómicas estudiadas (≈ 250 y 85 residuos $1000/$ residuos de aminoácidos respectivamente), lo que sugiere que es colágeno, la principal proteína extraída. Se ha informado que aproximadamente un tercio de los residuos de aminoácidos corresponde a Gly (Sikorski y Borderías, 1994; Moreno y col., 2012.).

Lo anterior fue confirmado con el contenido de Hyp en estas fracciones (35-40 residuos/1000 residuos de aminoácidos), que es un índice de la presencia de colágeno, después de multiplicar el contenido de Hyp (g / 100 g de muestra) por el factor de 21.56 (Sikorski y Borderías, 1994), por lo tanto, pueden ser considerados 85-90 % de colágeno en TCSP y TCI.

Gómez Guillén y col. (2012) no encontraron diferencias entre el perfil de aminoácidos de colágeno soluble en pepsina e insoluble obtenido de salmón atlántico de piscifactoría, concordante con los resultados presentados en este trabajo, donde se encontró el perfil de aminoácidos similar para las tres regiones anatómicas evaluadas.

Por otro lado, TCSS extraído de las tres regiones anatómicas mostró un patrón diferente, especialmente mayor contenido de Cys e inferior Hyp y Gly, lo que indica baja concentración de colágeno (37-50%) y la presencia de otras proteínas del estroma, tales como la elastina. Esta proteína es estable en sal, (Xiong, 1997; Kim y Park, 2005; Gómez-Guillén y col., 2012) y contiene Cys, aminoácido que no que forma parte de la estructura del colágeno (Morales y col., 2000; Gómez Guillén y col., 2012). Esto es consistente con el perfil electroforético (Figura 6), que se discutió anteriormente.

Por último, la concentración de Lys fue tres veces mayor en TCSS que TCSP y TCI, aunque su presencia es abundante en la estructura de colágeno, esto es específico para la

región de telopéptidos (Gómez Guillén y col., 2012). La vía básica de entrecruzamiento está regulada principalmente por el patrón de hidroxilación de telopéptido y dominio de residuos de lisina, dejando Lys como el principal contribuyente para la estabilización de la molécula de colágeno a

Tabla 2. Concentración de aminoácidos presentes en TCSS, TCSP y TCI de aleta, manto y tentáculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Aminoácido	Aletas			Manto			Tentáculos		
	TCSS	TCSP	TCI	TCSS	TCSP	TCI	TCSS	TCSP	TCI
Aspartato	61	46	48	66	41	48	64	51	40
Hidroxiprolina	17	32	40	19	37	44	26	41	37
Ácido glutámico	71	49	50	70	44	45	79	54	44
Serina	59	48	56	49	58	53	61	38	56
Glicina	93	254	252	90	249	264	81	259	244
Histidina	34	33	29	32	28	28	27	30	28
Arginina	56	39	51	59	49	53	60d	24	47
Treonina	48	76	70	49	71	66	45	76	73
Alanina	71	67	62	66	62	64	74	72	59
Prolina	144	78	87	153	83	98	140	90	85
Tirosina	31	30	35	34	40	32	30	20	45
Valina	45	52	44	47	47	41	51	43	47
Metionina	30	40	33	35	35	32	28	45	35
Cisteína	52	7	2	62	2	1	56	12	2
Isoleucina	40	44	36	35	39	32	37	49	40
Leucina	55	58	49	53	53	45	48	63	54
Fenilalanina	50	34	40	48	44	36	55	20	47
Lisina	43	13	17	33	18	18	38	13	17

Los resultados representan un promedio de 3 determinaciones. Las desviaciones estándar fueron para todos los casos inferiores al 5 %. TCSS: Tejido conectivo soluble en sal, TCSP: Tejido conectivo soluble en pepsina, TCI: Tejido conectivo insoluble

través de enlaces covalentes intramoleculares basado en su modificación estructural (Eyre y Wu, 2005; Gómez- Guille y col., 2012).

Por lo tanto, la solución de sal neutra utilizada en este experimento, probablemente extrajo proteínas del tejido conectivo insignificadamente entrecruzadas presentes en el tejido de las aletas, el manto y los tentáculos de calamar gigante, ya que este es el disolvente más comúnmente utilizado para colágeno recién sintetizado (Fries y col., 1998).

Perfil de textura

Se evaluó la resistencia al corte de cada región anatómica en cada uno de los días de muestreo del almacenamiento en hielo. En la tabla 3 y en la figura 10 se muestran los datos obtenidos. Los resultados nos indican un incremento en la firmeza del músculo de manto y tentáculos que llega a su máxima expresión en el día 10 de su almacenamiento en hielo. A partir de aquí la firmeza del músculo comienza a descender. Caso totalmente distinto muestran los resultados en las aletas, donde la firmeza del músculo sigue aumentando cuando menos hasta el día 20 de su almacenamiento. Estos resultados indican que en el tejido conectivo de los tentáculos y el manto de calamar, se vuelven más suaves con el tiempo si se tiene almacenado en hielo. Por algunos factores asociados con la proteólisis causada por las enzimas endógenas y microbianas como se informó anteriormente para varias especies de calamar, incluyendo calamar gigante (Ando y col., 1999). Por otra parte, Fimbres-Romero (2015) evaluó los parámetros texturales de manto de calamar gigante helado durante 20 días, encontrando un aumento de la resistencia al corte después de 10 días con posterior disminución. Es importante señalar que la edad y el tamaño de estos organismos son los mismos que el utilizado en este trabajo.

Tabla 3. Cambio en la fuerza requerida para el corte del musculo de las diferentes regiones anatómicas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante su almacenamiento en hielo.

Días de almacenamiento	Resistencia al corte (N)		
	Aleta	Manto	Tentáculo
0	24.63 ± 3.41	21.08 ± 3.32	58.19 ± 11.80
5	25.33 ± 1.07	25.12 ± 4.84	92.07 ± 9.40
10	31.38 ± 2.82	44.81 ± 8.91	96 ± 7.60
15	34.42 ± 3.31	40.5 ± 6.71	85.71 ± 7.65
20	45.5 ± 12.91	37.95 ± 6.22	95.12 ± 8.94

CONCLUSIONES

El porcentaje de colágeno insoluble en las proteínas del tejido conectivo aumenta durante los primeros 15 días de almacenamiento en hielo en el músculo de calamar gigante. Sin embargo, las aletas y manto mostraron una disminución después de 20 días, mientras que los tentáculos presentan un incremento constante. Ese aumento durante la manipulación en frío del músculo de calamar gigante puede estar relacionado con los mecanismos de entrecruzamiento producidos por lisil oxidasa. Por otra parte, la disminución de la fracción de TCI en las aletas y el manto después de 20 días podrían estar relacionados con una mayor actividad proteolítica endógena de los tentáculos. En base a los resultados obtenidos de la electroforesis en SDS-PAGE y calorimetría diferencial de barrido, las proteínas del tejido conectivo sufren cambios en su agregación y resistencia térmica durante su almacenamiento en hielo, especialmente en el manto. Por lo tanto, se concluye que el almacenamiento en hielo de músculo de calamar gigante tiene una influencia sobre la solubilidad y la temperatura de desnaturalización de proteínas del tejido conectivo. Lo cual termina repercutiendo sobre la textura del musculo de las diferentes regiones anatómicas, alcanzando un máximo de firmeza al día 10 de almacenamiento en hielo. Aunque si bien está documentado que las proteínas miofibrilares son las principales relacionadas con la textura del musculo, podemos concluir que también las proteínas del tejido conectivo aportan una influencia sobre la textura del músculo.

REFERENCIAS

- Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., & Myoshi, M. 468 (1999). Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness. *Journal of Food Science*, 64(4), 470 659–662
- Ando, M., Makino, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. & Miyoshi, M. (2001). Interdependence between heat stability and pyridinoline contents of squid mantle collagen. *Journal of Food Science*.
- Ando, M., Nakagishi, Y., Yoshida, K. et al. (2006). Pyridinoline concentration in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science*.
- A.O.A.C. (1980). Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis*. Washington, D.C.
- Badii, F. & Howell, N. (2002). Effect of antioxidants, citrate and cryoprotectants on protein denaturation and texture of frozen cod (*Gadus morhua*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2053-2061.
- Badii, F. & Howell, N. (2003). Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- Badui, D. (2005). *Química de los Alimentos*. 4ta ed. Ed. Pearson Addison Weley. México. pp. 154-163
- Bailey, A. & Etherington, D. (1980). Metabolism of collagen and elastin. In M. Florkin & E. H. Stotz (Eds.). *Comprehensive biochemistry* (Vol. 19B(1), pp. 299–460). New York: Elsevier Applied Science.
- Belitz, H. & Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. Segunda edicion. Springer- Verlag. Berlin Heidelberg. Impreso en Alemania pp. 527-589.
- Borderías, A. & Montero, P. (1985). Changes in fish muscle collagen during frozen storage. *Science et Technique du Froid*, 4, 85–92.
- Cui FX, Xue CH, Li ZJ, Zhang YQ, Dong P, Fu XY & Gao X (2007). Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chem* 100:1120–1125
- Da-Wen, S. (2001). *Advances in food refrigeration*. Leatherhead Food Research Association Publishing. p.318.

- Diario Oficial de la Federacion, (2014). ACUERDO POR EL QUE SE DA A CONOCER EL PLAN DE MANEJO PESQUERO DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*).
- Eyre, D. (1987). Collagen crosslinking amino acids. In: Methods in Enzymology (edited by L.W. Cunningham). Pp. 115–139. London: Academic Press.
- Ezquerro-Brauer, J., Haard, N., Ramírez-Olivas, R., Olivas-Burrola, H. & Velázquez-Sánchez, C. (2002). Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). J. Food Biochem. 26, 459–475.
- Fenemma O. (2000). Química de los alimentos. 2a ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Foegeding, E., Lanier, T. & Hultin, H. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. In O. R. Fennema (Ed.), Food chemistry (pp. 879–942). New York: Marcel Dekker.
- Fimbres-Romero J. (2015). Efecto del almacenamiento en hielo de aletas, manto y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sobre la actividad de lisil oxidasa y su relación con la textura del músculo. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias Químico Biológicas.
- Fujimoto, D., Akiba, K., & Nakamura, N. (1977). Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. Biochemical and biophysical research communications, 76(4), 1124-1129.
- Gallop, P., Blumenfel, O. & Seifter, S. (1972). Structure and metabolism of connective tissue proteins. Ann. Rev. Biochem. 41, 617- 672.
- Gaxiola, I. (2011). BCS, principal productor de calamar gigante y es quien menos lo aprovecha. In Peninsulardigital.com: Baja California Sur.
- Glaubrecht, M. & Salcedo-Vargas (2004). The Humboldt squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835): History of the Berlin specimen, with a reappraisal of other (bathy-)pelagic gigantic cephalopods (Mollusca, Ommastrephidae, Architeuthidae). Zoosystematics and Evolution 80(1): 53–69.
- Gómez-Guillén, M., Borderías, A. & Montero, P. (1997). Salt, non muscle proteins, and hydrocolloids affecting rigidity changes during gelation of giant Squid (*Dosidicus gigas*). J. Agric. Food Chem. 45, 616–621.
- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M., & Matsumoto, J.J. (1986). Contribution of connective tissues on the texture difference of various fish species. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52: 2001-2007.
- Hernandez-Herrera. A. (1997). Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) fishery in the Gulf of California, Mexico. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep. 39: 212-218.

- Horgan, D., King, N., Kurth, L. & Kuypers, R. (1990). Collagen crosslinks and their relationship to the thermal properties of calf tendons. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281, 21–26
- Hultin, H. (1993). Características del tejido muscular. En: *Química de los alimentos*. Director Fennema, O.R. Zaragoza España. pp 815-888.
- Kagawa, M., Matsumoto, M., Yoneda, Ch., Mitsunashi, T. & Hatae, K. (2002). Changes in meat texture of three varieties of squid in the early stage of cold storage. *Fisheries Science*, 68, 783–792.
- Kimura, S. & Tanaka H. (1986). Partial characterization of muscle collagens from prawns and lobster. *J. Food. Sci.* 51: 330-339.
- Klett, T. (1996). Pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). In: *Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur*, Instituto Nacional de la Pesca. SENEPECA, Mexico.
- Klomklao, S. (2008). *Digestive proteinases from marine organisms and their applications*. Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.
- Kolodziejska, I., Shikorski, Z. & Sadowska, M. (1987). Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influenced by specimen characteristics and treatments. *J. Food Sci.* 52: 932-935.
- Kugino, M. (1994). Influence of cooking temperature on the anisotropic rupture properties of squid mantle. *Memoirs of Kassui Womens' Junior College*. 37: 21-28.
- Kugino, M. & Kugino, K. (1994). Microstructural and rheological properties of cooked squid mantle. *J. Food Sci.* 59: 792-796.
- Lluch, M., Pérez, M. & Hernando I. (2001). Proteins in Food Structures. En “*Chemical and Functional Properties of Food Proteins*”. (Sikorski Z.E. Editor) Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster – Basel. USA. Pp. 13-33.
- Love, R., Lavety, J. & Vellas, F. (1982). Factor inducing mushiness in stored prawns. *Food Chem.* 29:119-132.
- Luna R., Urciaga G, Salinas Z, Cisneros M & Beltan M. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en Mexico y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*. 6(22): 535-560.
- Markaida U. & Sosa-Nishizaki O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fisheries Research*.54 (1), 63-82.
- Markaida U. (2005). El calamar gigante del Golfo de California. *ECOSUR*. 25:21-24.

- Márquez-Ríos, E., Morán, E., Lugo-Sánchez, M., Ocano-Higuera, V. & Pacheco-Aguilar, R. (2007). Postmortem Biochemical Behavior of Giant Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle Muscle Stored in Ice and its Relation with Quality Parameters. *Journal Of Food Science*, 72(7).
- Moreno-Martínez, A., (2011). *Calamar gigante (Dosidicus gigas): investigaciones, avances y aplicaciones del estudio de sus enzimas*. Tesis de licenciatura. México, Universidad de Sonora.
- Naito, F., Takahashi, S., Sato, Y., Noguchi, S., Naito, H. & Tanaka, T. (1996). Changes on the physical properties and sensory evaluation of squid muscle by vacuum cooking. *J. Home Econ. Jap.* 47: 153-159.
- Nesis, K. (1987). *Cephalopods of the World; Squids, cuttlefishes, Octopuses, and Allies*. In *T.F.H. Publications: Neptune City, NJ, USA*.
- Nielsen, S. (1994). *Introduction to the Chemical Analysis of Foods*. Ed. Jones and Bartlett Publishers. U.S.A. pp 209-212.
- Nigmatullin C., Nesis K. & Arkhipkin A. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda : Ommastrephidae). *Fish. Res.* 54: 9-19.
- Nip, W., Zeidan, H. & Moy, J. (1981). Aminoacid profile of insoluble collagen isolated from fresh water pawn. *J. Food Sci.* 46:1633.
- Norman, M. (2000) *Cephalopods. A world Guide*. Hackenheim, ConchBooks.
- Ochiai, Y., Kariya, Y., Watabe, S. & Hashimoto, K. (1985). Heat-induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. *J. Food Sci.* 50: 981-984.
- Olaechea, R., Ushio, H., Watabe, S., Takada, K. & Hatae, K. (1993). Toughness and collagen content of abalone muscles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 6-11.
- Otwell, W. & Hamann, D. (1979). Textural characterization of squid (*Loligo pealei* L.): Instrumental and panel evaluations. *J. Food Sci.* 44: 1636-1643.
- Otwell, W. & Giddings, G. (1980). Scanning Electron Microscopy of Squid, *Loligo pealei*: Raw, Cooked , and Frozen Mantle. *Marine Fisheries Review.* 42(7-8): 67-73.
- Paredi, M., Roldan, H. & Crupkin, M. (2006). Changes in 526 myofibrillar proteins and lipids of squid (*Illex argentinus*) during 527 frozen storage. *Journal of Food Biochemistry*, 30(5), 604–621.
- Ramirez-Olivaz, R., Rouzaud-Sandez, O., Haard, N., Pacheco-Aguilar, R. & Ezquerra-Brauer, J. (2004). Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*.

- Ramirez-Suarez, J., Ibarra-León, L., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez Ma., García-Sánchez, G. & Carvallo-Ruiz, G (2008). Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. *Food Chemistry* 111. pp 586-591.
- Ranganna, S. (1977). *Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products*. Ed. McGraw-Hill Publishing Co. Ltd. New Delhi.
- Roper, C., Sweeney M. & Nauen C. (1984). *Cephalops of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries*. FAO. Fisheries Synopsis, 125: 277 pp.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J. & Montero, P. (2002). The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (*Illex coindetii*). *Food Chemistry*, 78(2), 149–156.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J. & Montero, P. (2003). Characterization and functionality of frozen muscle protein in volador (*Illex coindetii*), Pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrosa*). *J. Food Sci.* 68, 2164–2168.
- SAGARPA. (2009). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009.
- Salinas, Z., Sánchez, H. & Aragón, N. (2005). Programa maestro de la pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Programa Maestro de Comité Sistema Producto de la Pesquería de Calamar Gigante en el Estado de Sonora.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M., & Shimizu, Y. (1986). Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52, 1595–1600.
- Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K. & Kawabata, M. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. 1991. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1222-1225.
- Shahidi F. (2007). *Maximising the value of marine by-products*. Woodhead Publishing, Cambridge, UK. 532 p.
- Shapiro, F., Brickley-Parsons, D. & Glimcher, M. (1979). Biosynthesis of collagen crosslinks in rabbit articular cartilage in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 205-211.
- Sikorski, Z., Kolodziejaska, I. (1986). The composition and properties of squid meat food. *Comp. Biochem. Physiol.* 20: 213-224.
- Sivakumar, L. (1997). Purification and partial characterization of a type V collagen from the muscle of marine prawn, *Penaeus indicus*. *J. Biosci.* 22:131-140.

- Smith, S. & Judge, M. (1991). Relationship between pyridinoline concentration and thermal stability of bovine intramuscular collagen. *J. Anim. Sci.* 69: 1989-1993.
- Stanley, D. & Hultin, H. (1982). Quality factors in cooked North Atlantic squid. *Can. Inst. Food Sci. Technol.J.* 15: 277-282.
- Torres-Arreola W., Pacheco-Aguilar .R, Sotelo-Mundo R., Rouzaud-Sandez O.; Ezquerra-Brauer J. (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.
- Yeshajahu P. & Meloan C.E. (1987). *Food Analysis. Theory and Practice.* 2ª. Ed. AVI U.S.A. pp 753-758.
- Young, A., Braggins, J. & Barker, J. (1994). Pyridinoline on ovine intramuscular collagen. *Mea Sci.* 37: 297-303.
- Young, R. (2009). *Dosidicus Steenstrup 1857. Dosidicus Gigas (Orbigny 1835). Jumbo squid.* Version 29 December 2009 (under construction). http://tolweb.org/Dosidicus_gigas/19945/2009.12.29 in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org>
- Yoshinaka, R., Mizuta, S., Itoh, Y. & Sato, M. (1990). Two genetically distinct types of collagen in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96B, 451–456.