



Universidad Autónoma del Estado de México.



Facultad de Química.

Programa de Maestría en Ciencias Químicas

Efecto de extracto de orégano sobre características fisicoquímicas y estructurales de un gel cárnico a base de calamar gigante durante su vida útil.

Tesis, que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas presenta:

Q.A. Francisco Antonio López Medina

Dirigido por:

Dr. Octavio Dublán García

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Toluca Estado de México, agosto 2017

Índice

Resumen	6
Introducción	7
1. Antecedentes	9
1.1. Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	9
Extracción de proteínas	13
Proceso de gelificación	13
1.2. Especies y su aplicación en alimentos	14
Capacidad antimicrobiana	17
1.2.1. Agentes bacteriostáticos vs bactericidas	17
1.2.2. Modos de acción de los antimicrobianos	18
1.2.3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana	19
Capacidad antioxidante	19
2. Hipótesis	22
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. Metodología	23
4.1. Evaluación de las características fisicoquímicas y estructurales del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	24
4.1.1. Análisis bromatológico	25
4.1.1.1. Humedad	25
4.1.1.2. Cenizas	25
4.1.1.3. Extracto etéreo	25
4.1.1.4. Nitrógeno total	26
4.1.1.5. Proteína	26
4.1.1.6. Valor de pH	27

4.1.2. Análisis microbiológico	27
4.1.2.1. Dilución de la muestra	27
4.1.2.2. Mesófilos aerobios	27
4.1.2.3. Hongos y levaduras	28
4.1.2.4. Coliformes totales por vaciado en placa	28
4.1.2.5. Coliformes totales y fecales por el método del número más probable	28
4.1.2.6. Presencia de <i>Salmonella</i> spp.	30
4.1.2.7. Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
4.2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos acuosos de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	32
4.2.1. Proceso de extracción	33
4.2.1.1. Determinación de la relación orégano-agua y tiempo de extracción	33
4.2.2. Contenido de compuestos fenólicos totales	34
4.2.3. Capacidad antioxidante	35
4.2.3.1. Método ABTS•+	35
4.2.3.2. Método DPPH•	35
4.2.4. Actividad antimicrobiana	36
4.3. Desarrollo del gel cárnico a base de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	37
4.3.1. Proceso de extracción proteica	38
4.3.2. Concentración proteica	39
4.3.3. Solubilidad	39
4.3.4. Capacidad de Retención de Agua (CRA)	40
4.3.5. Capacidad espumante y emulsionante	40
4.3.6. Capacidad de gelificación	41
4.3.7. Rendimiento de cocción	41
4.3.8. Análisis de Perfil de Textura (TPA)	42

4.3.9. Perfil de pesos moleculares SDS-PAGE	42
4.4. Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos acuosos de orégano sobre las características fisicoquímicas y estructurales del gel cárnico durante su vida útil a bajas temperaturas	43
4.4.1. Evaluación del porcentaje en peso de adición	44
4.4.1.1. Porcentaje máximo	44
4.4.1.2. Niveles de aplicación	45
4.4.2. Almacenamiento en refrigeración	46
4.4.2.1. Concentración proteica	46
4.4.2.2. Determinación de pH	46
4.4.2.3. Cuantificación de bases volátiles totales	46
4.4.2.4. Determinación de compuestos fenólicos totales	47
4.4.2.5. Determinación de grupos sulfhidrilo libres	47
4.4.2.6. Determinación de trimetilamina	48
4.4.2.7. Perfil de textura	49
4.4.2.8. Análisis microbiológico	49
5. Resultados y discusión	50
5.1. Evaluación de las características fisicoquímicas y estructurales del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	50
5.2. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos acuosos de orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	51
5.3. Desarrollo del gel cárnico a partir del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	55
5.4. Evaluación del efecto del extracto sobre el gel cárnico	64
6. Conclusiones	75
7. Bibliografía	75
Anexo I	85
8. Artículo	85

Anexo II	107
8.1. Estándar 0.5 de McFarland	107
8.2. Capacidad antimicrobiana del extracto	108
8.3. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) en las muestras de gel	108
8.4. Curva de calibración para determinación de concentración proteica por la técnica de biuret.	109
8.5. Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales por la técnica de Folin-Ciocalteu.	109

Resumen

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco de importancia económica en México, el 80% de esta especie se considera comestible, a pesar de que es una especie con alto contenido proteico (~18%) y bajo contenido de colesterol, la alta actividad enzimática que posee (enzimas endógenas y microbianas) genera una degradación proteica y por consecuencia, un descenso en las propiedades funcionales desde el punto de vista estructural. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un gel cárnico a base de esta especie y evaluar el efecto de la aplicación de un extracto acuoso de orégano durante el almacenamiento en refrigeración. Se evaluaron 4 métodos de extracción proteica; el proceso denominado B presentó las características apropiadas para el desarrollo del gel. Se adicionó el extracto de orégano (obtenido empleando una relación orégano-agua 1:15 y un tiempo de agitación de 15 min a 20°C) en un 5% v/v respecto a la disolución proteica a gelificar. La adición del extracto disminuyó la producción de bases volátiles y trimetilamina durante el almacenamiento. En cuanto al desarrollo microbiológico, existe una diferencia de 0.4 unidades logarítmicas en cuanto al conteo de mesófilos aerobios y de 2.7 unidades logarítmicas en el conteo de coliformes totales, ambas a favor de la muestra con extracto. Respecto a las características estructurales, no existe diferencia significativa entre las muestras, con y sin extracto, en el parámetro de dureza al final del almacenamiento. La adición de extracto acuoso de orégano permitió mantener las características fisicoquímicas y microbiológicas del gel durante el periodo de almacenamiento.

Introducción

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco de importancia económica en México, el 80% de esta especie se considera comestible y el 20% restante son las vísceras (Blanco-Pascual *et al.*, 2014), dentro de la parte comestible el manto representa el 70 y el 30% restante los tentáculos; a pesar de que es una especie con alto contenido proteico y bajo contenido de colesterol, su consumo en nuestro país es bajo, siendo un producto dirigido principalmente a exportación. El desarrollo de nuevos productos empleando como ingrediente esta materia prima, es una forma de incentivar su consumo dentro de la población que desconoce las formas de preparación y el sabor de esta especie cárnica. Para lograr dichos desarrollos, es necesario contar con materia prima que cumpla con las características óptimas para su aplicación en las formulaciones.

Debido a que ésta especie presenta un alto contenido en proteínas, es susceptible a degradación por enzimas endógenas y microbianas, disminuyendo su vida útil y su uso tecnológico (Ramirez-Suárez *et al.*, 2008). En la actualidad se han realizado estudios los cuales emplean diversos métodos de conservación para alargar la vida útil, entre estos se encuentran: el control térmico, uso de inhibidores enzimáticos y el uso de especias como canela, orégano y clavo entre otros, ya sea por separado o en combinación de éstos. Los compuestos bioactivos presentes en algunas de estas especias han sido probados como inhibidores microbianos y como antioxidantes (Gómez-Estaca *et al.*, 2009).

El orégano (*Origanum vulgare* L.) es una especia ampliamente utilizada en México dentro de diversos platillos, y se ha demostrado que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de varios microorganismos patógenos presentes en alimentos, así como reducir la oxidación de lípidos en productos cárnicos (Scramlin, 2010).

El proyecto de investigación tuvo como principal aportación evaluar los extractos acuosos obtenidos del orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre las características fisicoquímicas y estructurales, así como su efecto sobre la calidad microbiológica del gel cárnico a base de manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), como una alternativa de conservación para incrementar su vida útil durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

1. Antecedentes.

1.1. Calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una especie de importancia económica en México, de acuerdo a los datos proporcionados por SAGARPA, en el año 2013 el calamar se encontraba posicionado en séptimo lugar de la producción pesquera en México, siendo el volumen de captura de 36,381 toneladas y su valor en el lugar 20 (174,899 miles de pesos), de acuerdo al anuario estadístico publicado por la entidad.

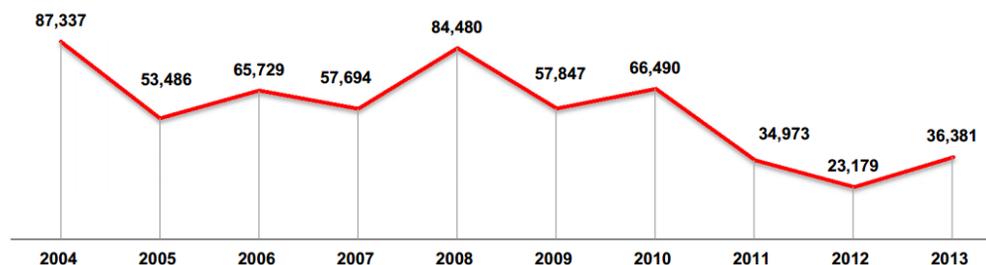


Figura 1 - Serie histórica de la producción de calamar (Peso vivo en toneladas) de acuerdo a SAGARPA, 2013.

Debido a las características propias de esta especie, el traslado hacia zonas centrales del país es escaso, aunado a esto, el desconocimiento de la existencia por parte de la población, así como las formas de preparación genera un bajo consumo del producto, como consecuencia, la mayor parte de la producción se exporta, encontrándose en el lugar número 10 de las especies pesqueras exportadas,

teniendo como principal destino países como China, Filipinas y Japón (SAGARPA; 2013).

Por ello, es necesario recurrir al desarrollo de nuevos productos que incluyan esta especie de importancia económica, con el objetivo de fomentar su consumo entre la población mexicana.

Uno de los principales retos al emplear el calamar gigante como parte de un producto es la alta actividad enzimática que posee (enzimas endógenas y microbianas), que genera una rápida degradación proteica y por consecuencia, un descenso en las propiedades funcionales en el aspecto estructural que aportaría a un producto.

Dadas estas condiciones, el empleo de calamar gigante en un producto cárnico representaría algunas desventajas, ya que la población en general tiende a relacionar una textura firme con productos cárnicos de buena calidad. Además, debido al tiempo que transcurre entre la captura del molusco y su llegada al mercado, se produce una pérdida rápida de la calidad textural post-mortem.

Por lo cual, en la comunidad científica se han desarrollado diversas metodologías para obtener concentrados proteicos con un mayor rendimiento provenientes del calamar gigante. Entre los distintos procesos empleados para este fin se encuentra la modificación en la fase de solubilización de las proteínas (Palafox, 2009), en el cual se realizan cambios de pH durante el proceso de extracción de la proteína

miofibrilar. En este tipo de procesos, se han obtenido extractos proteicos con propiedades diversas generando varios avances, entre ellos su utilización para la formación de películas, como una opción de empaque biodegradable (Blanco-Pascual *et al.*, 2014).

Uno de los principales problemas que se presentan con este nuevo procedimiento de extracción es la intervención de enzimas proteolíticas, ya que tienen un punto óptimo de actividad en los intervalos de pH empleados en los procedimientos de extracción proteica, los grupos de proteasas activas que se han identificado son: catepsinas activas en valores de pH 3.0 a 6.0 y proteasas neutras en un intervalo de 7.5 a 10.5 (Goll *et al.*, 1983). Por ello es importante mejorar estos procesos de extracción para obtener un concentrado proteico con mínima actividad enzimática residual.

El principal producto generado con los procedimientos de extracción proteica es el surimi, ingrediente principal en una variedad de comida procesada como kamaboko, kanikamaboko, salchichas de pescado y albóndigas de pescado. La calidad en estos productos depende principalmente del surimi usado. Sin embargo, este pierde la habilidad de formación de gel rápidamente durante su almacenamiento en congelación, esto es debido a que el proceso de congelación causa la formación de cristales de hielo, lo cual resulta en la deshidratación de la proteína miofibrilar, disminución del pH y cambios en la concentración de sales (Nopianti *et al.*, 2011). La utilización de materias primas congeladas por periodos

prolongados, sin las medidas de control adecuadas, tiene como consecuencia una disminución en las propiedades mecánicas y estructurales del producto final

Se han empleado diversas tecnologías para prevenir estos problemas, incluyendo el uso de crioprotectores como azúcares y polialcoholes; esencialmente un crioprotector debe mantener la funcionalidad de las proteínas congeladas, presentar una tendencia baja a causar oscurecimiento del producto mediante reacciones de oscurecimiento durante el almacenamiento y durante el calentamiento, así como una baja contribución de sabor (United States Patent, 5436024).

Además de la protección de las proteínas durante el proceso de congelación, es necesario mejorar las características mecánicas de productos tipo gel elaborados a partir de especies marinas. Dentro de los compuestos que se han empleado en la proteína de calamar gigante se encuentran ácido cítrico, citrato de sodio, pirofosfato de sodio y cloruro de sodio. Se ha observado que el ácido cítrico reduce el nitrógeno básico volátil y mejora la firmeza, mientras que el citrato de sodio coadyuva a incrementar el rendimiento de cocción (Paraskevoula, 2012).

Para lograr el desarrollo óptimo de un producto a partir de especies como *Dosidicus gigas* es de utilidad la aplicación de procesos de modificación de pH para lograr extraer las proteínas miofibrilares presentes, así como conocer el proceso de desarrollo del fenómeno de gelificación.

- **Extracción de proteínas.**

Dentro de las características de las proteínas, el punto isoelectrico (pI) es una de las ampliamente estudiadas, y es definido como aquel intervalo de pH en el que la carga neta es cercana a cero, y es posible determinarlo experimentalmente empleando una curva de solubilidad. En general, a valores menores y mayores al pI se incrementa la solubilidad de éstas macromoléculas, esto se debe a la modificación en la carga neta, debido a la cual se incrementa la interacción agua-proteína y existen fuerzas de repulsión entre moléculas con la misma carga, evitando así la formación de agregados y precipitación (Sathe, 2012). Este tipo de fenómenos resultan de utilidad durante los procesos de extracción, al utilizar pH extremadamente ácidos o alcalinos es posible solubilizar la mayoría de las proteínas existentes en una muestra, lo que permite eliminar otros componentes como tejido conectivo. Por otra parte, el pI permite selectividad en la extracción de proteínas, ya que este depende en su totalidad de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman éstas moléculas.

- **Proceso de gelificación.**

El proceso de gelificación de las proteínas es dinámico, existe formación y ruptura de interacciones de diversas naturalezas, como puentes hidrógeno, fuerzas Van der Waals, fuerzas dipolo-dipolo, entre otras. Este proceso, se desarrolla en varias etapas, de acuerdo al proceso térmico que es empleado. En la etapa de ajuste se mantiene una temperatura de 40-45°C durante un periodo de tiempo variable, esto permite a las proteínas comenzar el proceso de

desdoblamiento y formación de las primeras interacciones proteína-proteína. La segunda etapa consiste en el incremento gradual de la temperatura hasta alcanzar la temperatura de gelificación entre 70-75°C en el centro térmico, esto permite la formación de la red proteica que incluye agua dentro de ella, formación de interacciones agua-proteína, proteína-proteína y grasa-proteína. Posteriormente existe una etapa de choque térmico, en la cual se disminuye la temperatura empleando agua y hielo, provocando una contracción de la red formada y la expulsión de una fase líquida que contiene agua, proteínas, sales y grasa (Feiner, 2006).

1.2. Especies y su aplicación en alimentos.

El deterioro de la calidad de los alimentos que se produce durante el procesamiento-almacenamiento y que está relacionado con procesos oxidativos, afecta principalmente a lípidos y proteínas. En los últimos años, el interés en los aditivos alimenticios derivados de plantas se ha incrementado, debido a la tendencia de su uso en el procesamiento de alimentos, empleados como conservadores, potenciadores de sabor y aromatizantes. Por esta razón, uno de los enfoques principales de la industria alimentaria está dirigido hacia especies vegetales con fitoquímicos que ayuden en la preservación y mejoramiento del aspecto del alimento (Sevilla, 2013).

Las especias además de impartir sabor, pueden ser utilizadas como una alternativa de conservación y un método de control de patógenos en productos alimenticios. La aplicación de antimicrobianos de origen vegetal podría emplearse como alternativa a los conservantes químicos. En este sentido, las especias consideradas con actividad antimicrobiana en orden decreciente son: orégano (*Origanum vulgare* L.), cilantro (*Coriandrum sativum*), canela (*Cinnamomum verum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*), mostaza (*Sinapis* sp.) y salvia (*Salvia officinalis*) (Suárez-Mahecha *et al.*, 2011).

Encontrar las especias y las hierbas más adecuadas depende de una serie de factores como el tipo, efecto sobre las propiedades organolépticas, composición, concentración, propiedades biológicas de los antimicrobianos, procesamiento y condiciones de almacenamiento. De todas formas, la mezcla de especias es un factor importante para el desarrollo del sabor y pueden prevenir el efecto de los metabolitos microbianos y oxidación de algunos ácidos grasos (Suárez *et al.*, 2011).

Al respecto sobre estas aplicaciones, los resultados de las investigaciones destacan lo siguiente (Gómez-Sánchez, 2009):

- La estructura física del alimento puede limitar la actividad antimicrobiana del aceite esencial.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias requeridas en alimentos son mayores a las registradas in vitro.

- La acción antimicrobiana de los aceites esenciales se reduce considerablemente en carnes, productos cárnicos y pescado con alto contenido de grasa.
- El contenido de proteínas de los alimentos es un factor limitante en la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales o sus componentes.
- En verduras y productos de carne, la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es favorecida por una disminución tanto en la temperatura de almacenamiento como en el pH del alimento.
- En frutas, la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes aumenta conforme el pH disminuye.

De acuerdo a lo anterior, se ha sugerido que el uso de los antimicrobianos naturales se lleve a cabo en combinación con factores de control microbiano tales como temperatura, actividad de agua y pH, entre otros (Gómez-Sánchez, 2009).

Debido a lo anteriormente expuesto, la investigación de extractos acuosos obtenidos de especias y su aplicación sobre sistemas alimenticios (derivados de cárnicos marinos como el calamar gigante) se ha identificado como un área de oportunidad para el estudio de alternativas de conservación al mismo tiempo que se han empleado técnicas para el incremento de la vida útil de productos marinos derivados de extractos proteicos.

- **Capacidad antimicrobiana.**

Cada tipo de agente antimicrobiano tiene un modo de acción único. Para entender cómo actúan los agentes antimicrobianos es necesario conocer algunas características básicas de la estructura celular bacteriana y cómo funcionan los blancos de los antimicrobianos en la célula bacteriana.

A pesar de que las estructuras de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son similares, existen algunas diferencias claves. Éstas, son las bases de la capacidad que tiene un agente antimicrobiano para inhibir el crecimiento ya sea de bacterias Gram-positivas o negativas. Sin embargo, algunos agentes actúan en ambos tipos de bacteria y éstos a menudo se conocen como agentes de amplio espectro (McCarter, 2005).

1.2.1. Agentes bacteriostáticos vs bactericidas.

Los agentes bacteriostáticos tales como tetraciclina inhiben el crecimiento y multiplicación de las bacterias. A partir de la exposición a un agente bacteriostático, las células en una población susceptible cesan su división. Sin embargo, si el agente es retirado, las células vuelven a multiplicarse.

Los agentes bactericidas, como las fluoroquinolonas, no solo inhiben el crecimiento de las células sino también desencadenan mecanismos dentro de la célula que conducen a la muerte celular. Las acciones de los agentes bactericidas son irreversibles por tanto una vez que las células

susceptibles son expuestas al agente bactericida, mueren (McCarter, 2005).

1.2.2. Modos de acción de los antimicrobianos.

Los agentes antimicrobianos se clasifican de acuerdo a sus modos específicos de acción contra las células bacterianas. Éstos, pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácidos nucleicos, o inhibir una ruta metabólica. Los modos de acción de los agentes antimicrobianos contra las bacterias Gram-positivas y negativas son similares (McCarter, 2005).

Interferencia con la síntesis de la pared celular: bloquean la síntesis del peptidoglicano y por tanto son activos contra bacterias en crecimiento, siendo bactericidas.

Interferencia con la síntesis de proteínas mediante el enlace a la subunidad ribosómica 30S: bloquean la adherencia del RNA de transferencia (tRNA) en la subunidad antes mencionada, generando que no se puedan agregar más aminoácidos a la cadena de proteínas que está en crecimiento y por lo tanto la síntesis de proteínas es inhibida.

1.2.3. Mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Hay una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos. Estos incluyen: 1) producción de enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que este alcance su blanco o modifican el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su target; 2) impermeabilidad de la pared celular al agente antimicrobiano; 3) alteración del sitio de ataque por mutación lo que ya no permite la unión del agente antimicrobiano; 4) modificación de la bomba de eflujo que expelle al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco; 5) alteración de rutas metabólicas específicas dentro de la bacteria para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto (McCarter, 2005).

- **Capacidad antioxidante.**

Es de gran interés para el público en general, y para expertos en medicina y nutrición e investigadores en alimentación y salud, conocer los constituyentes de los alimentos que consumimos, así como la capacidad que pueden tener como antioxidantes exógenos sobre las funciones biológicas de los organismos. Debido a la complejidad de la composición de los alimentos, separar cada compuesto antioxidante y estudiarlo individualmente es costoso e ineficiente, subestimando las posibles interacciones sinérgicas entre los compuestos antioxidantes en una mezcla alimenticia. Así mismo, es necesario para los investigadores poseer un método conveniente para la rápida cuantificación de la efectividad antioxidante. Algunos autores sugieren que un

protocolo general de pruebas debe: 1) elegir un sustrato biológico apropiado; 2) probar varias condiciones de oxidación; 3) medir productos iniciales y secundarios de oxidación; 4) comparar antioxidantes en la misma concentración molar de los componentes activos y 5) cuantificar en base al periodo de inducción, porcentaje de inhibición o tasa de formación/descomposición de hidroperóxidos (Huang *et al.*, 2005).

Un antioxidante alimenticio puede capturar especies reactivas de oxígeno/nitrógeno para detener reacciones en cadena de formación de radicales, o puede inhibir la formación inicial de las especies oxidantes (preventivo). Usualmente se incluyen en este grupo inhibidores de reacciones en cadena, quelantes de metales, inhibidores de enzimas oxidativas y cofactores de enzimas antioxidantes (Huang *et al.*, 2005). Al ser consumidos de manera regular pueden coadyuvar a reducir la oxidación celular.

Dentro de estas especias, se ha estudiado ampliamente al orégano (*Origanum vulgare* L.) y se ha demostrado que posee capacidad antimicrobiana sobre microorganismos patógenos encontrados en alimentos (Rodríguez-Sauceda, 2011). El aceite esencial de orégano ha demostrado poseer actividad antimicrobiana sobre *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Gómez-Sánchez, 2009)

La actividad antimicrobiana es debida al carácter hidrofóbico y lipofílico de los monoterpenos y compuestos fenólicos que contiene, éstos actúan sobre los lípidos a nivel de membrana, favoreciendo el flujo de electrones y de otros contenidos celulares hacia el exterior; la pérdida prolongada de estas partículas y compuestos conduce a la muerte de los microorganismos (Gómez-Sánchez, 2009).

Recientemente, se han realizado estudios sobre el efecto del aceite esencial de orégano sobre características de distintos cortes de carne de res. Se detectó la disminución de valores de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), lo cual indica una reducción efectiva de la oxidación de lípidos (Scramlin, 2010).

2. Hipótesis.

El uso de extractos acuosos de orégano con capacidad antimicrobiana y antioxidante en un gel cárnico a base de calamar gigante conservará por más tiempo las características fisicoquímicas y estructurales durante su vida útil.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

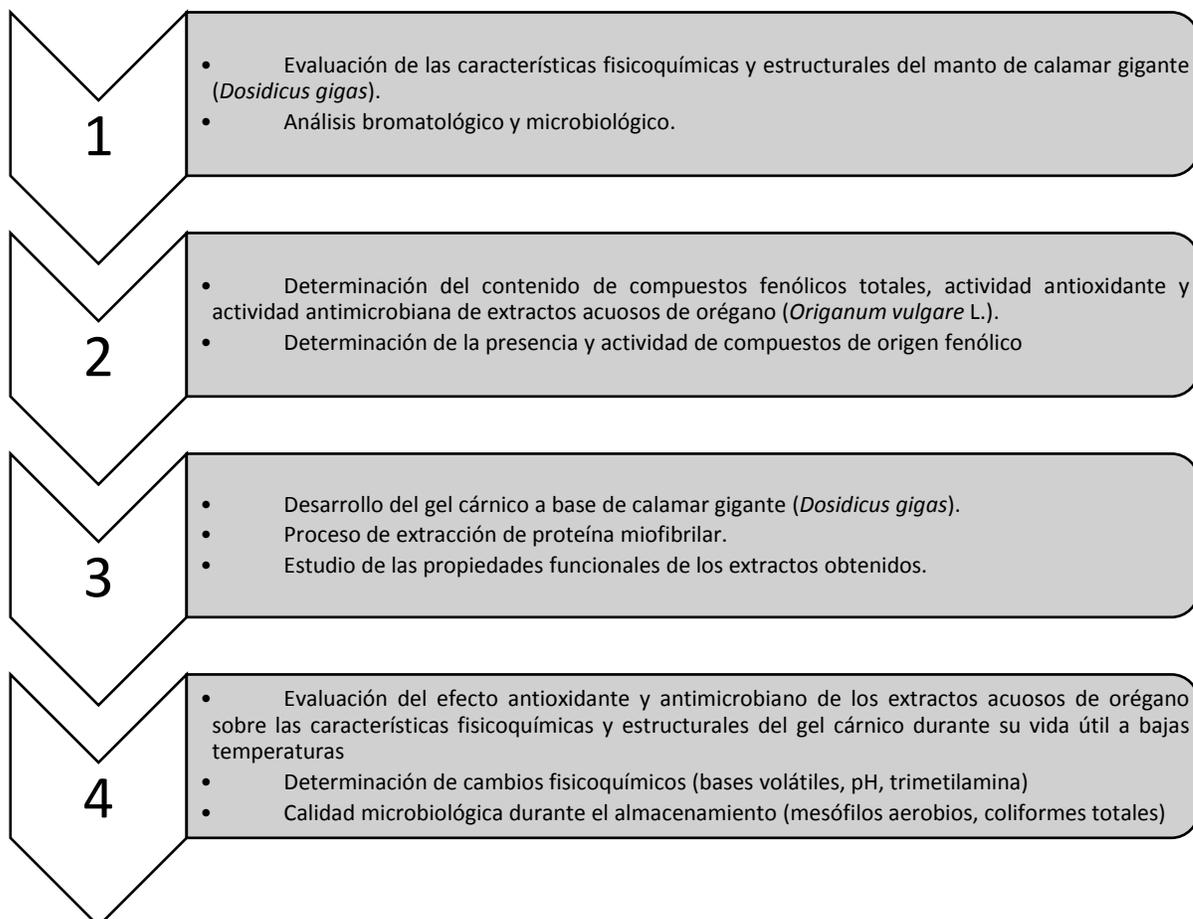
Evaluar el efecto de extractos acuosos de orégano con capacidad antimicrobiana y antioxidante sobre las características fisicoquímicas y estructurales de un gel cárnico a base de calamar gigante durante su vida útil.

3.2. Objetivos específicos.

- Evaluar las características fisicoquímicas y estructurales del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos acuosos de orégano (*Origanum vulgare* L.).
- Desarrollar un gel cárnico a base de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
- Evaluar el efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos acuosos de orégano sobre las características fisicoquímicas y estructurales del gel cárnico durante su vida útil a bajas temperaturas.

4. Metodología.

La metodología se llevó a cabo en 4 bloques. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Tukey HSD con un valor de $p < 0.05$ empleando el programa Statgraphics Centurion® 16.1.



4.1. Evaluación de las características fisicoquímicas y estructurales del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Debido a que las propiedades funcionales del manto de calamar gigante se ven afectadas por la edad, sexo, estado de madurez del animal, así como de la época del año en que se captura, es necesario llevar a cabo la caracterización de la materia prima obtenida para el desarrollo del proyecto, estableciendo así las características iniciales del manto de calamar gigante (Asgharzadeh *et al.*, 2010; Morachis, 2015; NOM-242-SSA1-2009; Ramirez, 2008; Scramlin, 2010).



Figura 2 – Manto de calamar gigante congelado, obtenido del centro de distribución.

Se obtuvo manto de calamar gigante (80cmx50cm, Figuras 2 y 3) congelado y se colocó en bolsas de polietileno en porciones de 80-90g y almacenado a -20°C hasta su utilización.

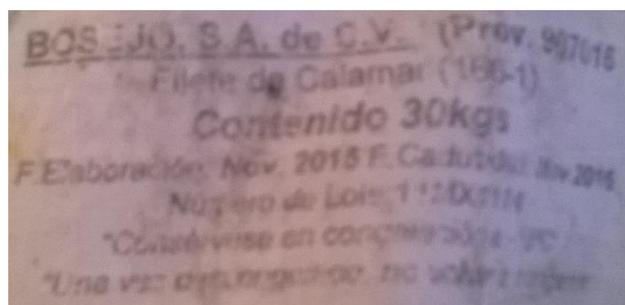


Figura 3 – Identificación del lote de calamar gigante.

4.1.1 Análisis bromatológico (AOAC, 1990).

4.1.1.1 Humedad (NOM-116-SSA1-1994).

Muestras de 5g de manto de calamar gigante fueron cortadas en porciones con un grosor de 2 mm y colocadas en charolas de aluminio. Las muestras fueron secadas en estufa a 55°C durante 12 horas. El porcentaje de humedad fue determinado mediante diferencia de pesos entre el peso inicial y final de las muestras.

4.1.1.2 Cenizas (NMX-F-066-S-1978).

Muestras de 5g de manto de calamar fueron cortadas en porciones con grosor de 2 mm y colocadas en charolas de aluminio. Las muestras fueron calcinadas en una mufla a 450°C durante 1 hora o hasta obtener cenizas de color blanco a gris claro. El porcentaje de cenizas fue determinado mediante diferencia de pesos entre el peso inicial y final de las muestras.

4.1.1.3 Extracto etéreo (NMX-F-615-NORMEX-2004).

Se pesó 1 g de manto de calamar gigante y se transfirieron a un mortero con 8g de sulfato de sodio anhidro, se mezclaron hasta obtener un granulado. La mezcla se colocó en un cartucho de celulosa y se insertó en el equipo. Se empleó éter de petróleo como solvente; la extracción se efectuó durante 5 horas, que representaron 8 ciclos. Posterior a la evaporación del disolvente, se determinó el porcentaje de grasa mediante la diferencia de pesos entre el peso del extracto obtenido y el peso inicial de la muestra.

4.1.1.4 Nitrógeno total (NMX-F-608-NORMEX-2011).

Se colocaron 1.2 g de muestra en cada tubo del equipo, junto a una tableta de catalizadores y 25mL de ácido sulfúrico concentrado. La digestión se llevó a cabo durante 2.5 horas. Posteriormente fueron neutralizadas con NaOH al 10% (p/v) en un destilador, recibiendo el destilado en matraces con 100mL de una disolución de ácido bórico al 2%. Se adicionó el indicador Shiro-Tashiro (0.125g de rojo de metilo en 10mL de NaOH 0.05N, 0.080g de azul de metileno en 90mL de agua destilada) y se tituló con ácido clorhídrico 0.1M, pasando de un color verde esmeralda a un rosa-canela. El nitrógeno total se determinó empleando el volumen gastado de ácido para cada muestra, la concentración de la disolución de ácido clorhídrico, el peso de la muestra y el factor de contenido de nitrógeno (6.25).

4.1.1.5 Proteína

Esta técnica está basada en la formación de un complejo entre un átomo de cobre y dos enlaces peptídicos consecutivos en una proteína, es decir, la prueba es positiva a partir de un tripéptido. El cambio de coloración en el reactivo es medible espectrofotométricamente, por lo que es posible comparar una muestra con una solución patrón de una proteína de concentración conocida.

Muestras sólidas (1g) fueron diluidas en relaciones 1:15 y 1:20 con una disolución de NaOH al 10% (p/v) y NaCl 0.6M. Muestras líquidas fueron adicionadas directamente. A 1mL de las disoluciones obtenidas se añadieron

3mL de reactivo (1.5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6g de tartrato de sodio tetrahidratado y 30g de NaOH en un litro de agua destilada hervida previamente). Las disoluciones se sometieron a reacción durante 30 min en oscuridad total y fueron leídas a 540 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10VIS (Palafox et al., 2009). La concentración proteica se obtuvo al extrapolar las absorbancias con una curva patrón de seroalbúmina bovina empleando un rango de concentración de 1-10 mg/mL de disolución.

4.1.1.6 Valor de pH (NMX-F-317-S-1978).

Se homogeneizaron 10g de muestra con 90mL de agua destilada y la disolución resultante fue filtrada. Se determinó el pH empleando un potenciómetro (Conductronic PH 120, México, México)

4.1.2 Análisis microbiológico.

4.1.2.1 Dilución de la muestra (NOM-110-SSA1-1994).

Diez g de muestra fueron homogeneizados con 90mL de agua peptonada (8.5 g NaCl y 1 g peptona por un litro de agua). Se realizaron diluciones decimales hasta llegar a un factor de 10^{-7} .

4.1.2.2 Mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994).

Inóculos de 0.1mL, a partir de la dilución 10^{-4} , fueron sembrados en agar cuenta estándar e incubados a 35°C durante 48 horas. El resultado fue reportado en unidades formadoras de colonias (UFC), empleando aquellas cajas donde aparecieron entre 25 y 250 UFC.

4.1.2.3 Hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).

Inóculos de 0.1mL, a partir de la dilución 10^{-4} , fueron sembrados en agar papa dextrosa, acidificado con ácido tartárico al 10% (en una relación 1.4mL de la disolución de ácido tartárico por 100mL de medio de cultivo) e incubados a 25°C durante 5 días. El resultado fue reportado en unidades formadoras de colonias (UFC), empleando aquellas cajas donde aparecieron entre 10 y 150 UFC.

4.1.2.4 Coliformes totales por vaciado en placa (NOM-113-SSA1-1994).

Inóculos de 0.1mL, a partir de la dilución 10^{-4} , fueron sembrados en agar bilis rojo violeta, empleando la metodología de doble capa para producir un ambiente de micro-anaerobiosis, e incubados a 35°C durante 24 horas. El resultado fue reportado en unidades formadoras de colonias (UFC) de aquellos microorganismos que producen un vire en el color del indicador y precipitación de sales biliares, empleando aquellas cajas donde aparecieron entre 15 y 150 UFC.

4.1.2.5 Coliformes totales y fecales por el método de número más probable (NOM-112-SSA1-1994; NOM-210-SSA1-2014).

El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (NOM-113-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa) o el uso de la técnica del número más probable. Esta última, también llamada técnica de dilución en

tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

Prueba presuntiva: Fueron empleadas las diluciones 10^{-1} ; 10mL de la primera dilución son transferidos a los tubos con medio de enriquecimiento (caldo lactosado) en mayor concentración (x 1.5); para la siguiente serie de tubos de concentración sencilla (x 1.0) se transfirió 1mL; para la última serie de tubos de concentración sencilla se transfirió 0.1mL de muestra. Posterior a 48 horas de incubación a 35 °C, se consideraron como tubos positivos aquellos que presentaron formación de gas visible en la campana de Durham.

Prueba confirmativa: Se prepararon el mismo número de tubos con medio de confirmación (10mL de caldo lactosa bilis verde brillante) que aquellos que fueron positivos a la prueba presuntiva. Se transfirió 0.1mL de cada tubo positivo de la prueba presuntiva a un tubo de la prueba confirmativa. Los tubos fueron incubados a 35 °C por 48 horas, se consideraron como positivos aquellos con formación de gas visible en la campana Durham.

Coliformes fecales: Se prepararon el mismo número de tubos con medio de confirmación (10mL de caldo EC) que aquellos que fueron positivos a la prueba presuntiva. Se transfirió 0.1mL de cada tubo positivo de la prueba presuntiva a un tubo de la prueba de coliformes fecales. Los tubos fueron

incubados a 44 °C por 48 horas, se consideraron como positivos aquellos con formación de gas visible en la campana Durham.

4.1.2.6 Presencia de *Salmonella* spp. (NOM-114-SSA1-1994; NOM-210-SSA1-2014).

Pre-enriquecimiento: se homogeneizaron 225mL de caldo lactosado con 25 g de muestra, se incubó a 35°C durante 24 horas.

Enriquecimiento: fueron empleados caldo tetrionato y caldo Rappaport-Vassiliadis (10mL en cada tubo, por muestra). Se transfirió 1mL del medio de preenriquecimiento a cada tubo de medio de enriquecimiento y fueron incubados a 35°C durante 24 horas.

Selección de medios sólidos: se utilizó agar sulfito de bismuto, agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar entérico Hektoen. Se realiza una siembra por estría a partir de cada tubo de medio de enriquecimiento.

Colonias típicas de salmonella en los medios de cultivo sólidos:

- Sulfito de bismuto: Colonias cafés, grises o negras con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro.
- Agar XLD: Colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

- Agar entérico Hektoen: Colonias verdes o azul-verdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

4.1.2.7 Presencia de *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994; NOM-210-SSA1-2014).

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias. Entre las razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.

Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.

Demostrar la contaminación post-proceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación post-proceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva (benéfica para el ser humano, como por ejemplo,

bacterias del género *Lactobacillus*) que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica.

Inóculos de 0.1mL, a partir de la dilución 10^{-1} , fueron sembrados en placas de agar Baird-Parker, extendiendo la muestra con varillas de vidrio en forma de “L” e incubados a 35°C durante 45 - 48 horas. El resultado fue reportado en unidades formadoras de colonias (UFC) típicas de *S. aureus*, empleando aquellas cajas donde aparecieron entre 15 y 150 UFC. Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

4.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos acuosos de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Debido a que la adición se hizo directamente al gel cárnico, se propuso realizar las extracciones en medio acuoso. Ya que los componentes mayoritarios serán aquellos más hidrófilos o polares, se llevaron a cabo los análisis pertinentes para determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana de dichos extractos.

4.2.1 Proceso de extracción.

4.2.1.1 Determinación de la relación orégano-agua y tiempo de extracción.

Debido a que los componentes de interés en el orégano (*Origanum vulgare* L.) presentan baja solubilidad en agua, la modificación en las variables de extracción, tales como temperatura, tiempo y relación orégano-agua, tiene un efecto sobre la cantidad de componentes extraídos.

Para ello, se desarrolló un diseño experimental, evaluando 3 niveles en la relación orégano-agua (1:10, 1:15 y 1:20) y dos niveles en el tiempo de extracción (15 min y 30 min), a temperatura ambiente (20°C), en base a los resultados obtenidos por Gómez-Estaca *et al.* (2009), donde se emplearon de 5 a 20g de orégano por 100mL de agua, con un tiempo de agitación de 10 min. Muestras de orégano seco fueron expuestas a luz UV durante 90 min, mezclándose cada 15 min para lograr una irradiación homogénea. Las hojas secas irradiadas fueron molidas hasta lograr un tamaño de partícula menor a 0.5mm. El polvo resultante fue suspendido en agua destilada y sometido a agitación en vortex en la relación orégano-agua y tiempo definidos. Debido a que los componentes que se pueden extraer en medio acuoso son principalmente ácidos de estructura fenólica (Gómez-Estaca *et al.*, 2009), se empleó el contenido de compuestos

fenólicos totales como parámetro para seleccionar las variables en el método de extracción.

4.2.2 Contenido de compuestos fenólicos totales

Se preparó una disolución de carbonato de sodio (0.7g de Na_2CO_3 en 10mL de agua destilada) y una disolución 1N del reactivo de Folín-Ciocalteau (empleando una dilución 1:1 del reactivo con agua destilada). Los volúmenes de disoluciones para llevar a cabo la reacción fueron los siguientes: 375 μL de Folín 1N, 1.875mL de la disolución de carbonato de sodio y 20 μL de muestra (diluida o no con agua destilada) y 730 μL de agua destilada (Gao et al., 2002; Martínez et al., 2012). Para llevar a cabo la lectura dentro del rango de la curva de ácido gálico se realizó una dilución de los extractos de orégano en una relación 1:4 con agua destilada (Figura 4). La reacción se llevó a cabo en oscuridad durante 1 hora y las muestras fueron leídas a 760 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S Vis (Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, E.E.U.U.).

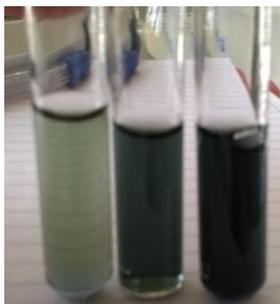


Figura 4 – Tubos de reacción con extracto de orégano diluido 1:4, 1:2 y sin diluir (de izquierda a derecha).

4.2.3 Capacidad antioxidante.

4.2.3.1 Método ABTS•+

La disolución stock se preparó con 5mL de una disolución de ABTS 7 mM y 88 µL de persulfato de potasio 140 mM, seguido de reposo en oscuridad durante 12 horas hasta producir una disolución de color verde oscuro. Posteriormente la disolución se diluyó con metanol hasta que la absorbancia alcanzó un valor de 0.74 en una longitud de onda de 734 nm.

Se colocaron 3mL de la disolución del reactivo ABTS•+ y se mezclaron con 50 µL de cada muestra y 50 µL de agua destilada. La lectura se llevó a cabo después de 10 min a 734 nm, se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación (Pellegrini *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2012):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} * 100$$

donde:

A_0 es la absorbancia del blanco de reactivos, y

A_f es la absorbancia de las muestras al tiempo final.

4.2.3.2 Método DPPH•

La reacción con el radical DPPH• se llevó a cabo adicionando 2.8mL del radical (DPPH•, 98.9 mM en metanol) con 50 µL de los extractos y 50 µL de agua destilada. Las mezclas fueron agitadas en vórtex por 15 s. La

disminución de la absorbancia del DPPH• se midió a una longitud de onda de 515 nm, desde el momento en que se añadió la muestra y cada 5 min hasta que no se observó cambio en la absorbancia de la muestra (40 min). El porcentaje de inhibición se calculó de la siguiente forma (Ranilla *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2012):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} * 100$$

donde:

A_0 es la absorbancia del blanco de reactivos, y

A_f es la absorbancia de las muestras al tiempo final.

4.2.4 Actividad antimicrobiana

Fue determinada mediante la metodología de Bauer-Kirby, con algunas modificaciones (Rojas *et al.*, 2005). Se utilizaron cepas de 24 horas de crecimiento de los microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella typhimurium* (obtenida de una muestra clínica por parte del área de Farmacia de la Facultad de Química de la UAEMex). Se utilizó el método de suspensión directa (Ortez, 2005) para obtener un cultivo líquido equivalente al estándar 0.5 de McFarland (ver Anexo 8.1), se realizó paralelamente un cultivo en placa de diluciones sucesivas a partir de los cultivos líquidos para determinar el número de células viables contra las cuales se analizó el extracto.

Placas con agar Mueller-Hinton, con una profundidad de 4.5 mm y 10 cm de diámetro, fueron inoculadas superficialmente con 100µL de los cultivos líquidos empleando hisopos estériles, siguiendo movimientos lineales desde el centro de la placa hacia los extremos 8 veces, utilizando direcciones distintas con ángulos de 45° entre cada eje tomado como referencia. Círculos de papel filtro Whatman® Grado 42 con tamaño de poro de 2.5µm, con un diámetro de 5mm fueron colocados en las cajas Petri inoculadas. Las cajas fueron divididas en 2, en un lado se colocaron 10µL de extracto de orégano sobre cada círculo de papel filtro, del otro lado se colocaron 10µL de disolución salina estéril (8.5g NaCl/L).

4.3 Desarrollo del gel cárnico a base de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Se empleó el concentrado de proteína miofibrilar del manto de calamar para el desarrollo del gel cárnico; se evaluaron distintos procedimientos de extracción proteica para obtener un extracto proteico con mínima actividad enzimática.

Dentro de las principales características a tomar en cuenta para la elección del gel cárnico, se encuentran la capacidad de gelificación y el rendimiento de cocción, siendo las principales características a evaluar. Posteriormente el análisis de perfil de textura sirvió como base para determinar la dureza del gel y así obtener el gel con mayor rendimiento de cocción, mayor capacidad de gelificación y mayor dureza. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente (20°C).

4.3.1 Proceso de extracción proteica

Se siguió la metodología propuesta por Palafox *et al.* (2009) con modificaciones. El colágeno del manto de calamar fue retirado manualmente, se homogeneizaron 100g de manto de calamar gigante con agua y hielo en una relación 1:1:1. Proceso A: la mezcla se sometió a una agitación en baño de hielo (2-4°C) durante 20 min, se filtró la muestra empleando una malla de abertura de 2mm x 2mm y se agitó nuevamente en baño de hielo por 10 min. La muestra fue centrifugada a 6500g durante 20 min. El precipitado obtenido se denominó concentrado A. Proceso B: el pH de la mezcla fue ajustado a 10.0 empleando carbonato de sodio 3.2M y se sometió a agitación en un baño de hielo (2-4°C) durante 15 min, posteriormente fue centrifugada a 6500g durante 20 min. El sobrenadante obtenido, el cual contiene la proteína soluble en medio alcalino, fue separado y su pH ajustado a 4.5 con ácido cítrico 2.3M (pH reportado como punto isoelectrico de las proteínas miofibrilares de calamar gigante por Sánchez-Alonso, 2005); la muestra fue centrifugada a 6500g durante 20 min y se tomó el precipitado para re-suspenderse y ajustar el pH a 6.5 con carbonato de sodio 3.2M, posteriormente se centrifugo la muestra bajo las mismas condiciones. El precipitado obtenido se denominó concentrado B. Proceso C: el pH de la mezcla fue ajustado a 3.0 empleando ácido cítrico 2.3M y se sometió a agitación en un baño de hielo (2-4°C) durante 15 min, posteriormente fue centrifugada a 6500g durante 20 min. El sobrenadante obtenido, el cual contiene la proteína soluble en medio ácido, fue separado y su pH ajustado a 4.5 con carbonato de sodio 3.2M (se observa la formación de espuma durante el proceso en la figura 5); la muestra fue

centrifugada a 6500g durante 20 min y se tomó el precipitado para re-suspenderse y ajustar el pH a 6.5 con carbonato de sodio 3.2M, posteriormente se centrifugo la muestra bajo las mismas condiciones. El precipitado obtenido se denominó concentrado C. Proceso D: El concentrado A es suspendido en agua y el pH es ajustado a 4.5 con ácido cítrico 2.3M y fue centrifugado a 6500g durante 20 min. El precipitado obtenido fue suspendido y el pH ajustado a 6.5 con carbonato de sodio 3.2M, posteriormente se centrifugó la muestra bajo las mismas condiciones. El precipitado obtenido se denominó concentrado D.



Figura 5 - Formación de espuma durante los procesos de precipitación/neutralización.

4.3.2 Concentración proteica

Para la determinación de la concentración de proteína se siguió la metodología descrita en el apartado 4.1.1.5.

4.3.3 Solubilidad

Se tomó 1g de concentrado proteico se homogeneizó con 4mL de agua destilada y se centrifugo la muestra a 6500g por 20 min, se empleó el método de biuret para determinar la proteína soluble en la fase líquida. El resultado se

presenta como porcentaje de solubilidad; la concentración de proteína soluble respecto a la concentración proteica de 1g de concentrado (Rawdkuen et al. 2009).

4.3.4 Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Se tomaron 5g de concentrado proteico y se homogenizaron con 8mL de una disolución de NaCl 0.6M durante 1 min. La muestra se centrifugó a 6500g durante 15 min; la capacidad de retención de agua se presenta como los mL de una disolución de NaCl 0.6M retenidos por 1g de concentrado proteico (Honikel *et al.*, 1980; Morachis *et al.*, 2015).

4.3.5 Capacidad espumante y emulsionante

Se prepararon disoluciones de 10mg de proteína por mL con amortiguadores de Tris-HCl 0.15M, a pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0; 10mL de las disoluciones fueron agitadas por 15s en un vórtex GENIE®2 (Scientific Industries, USA, NY) a velocidad máxima en tubos de polietileno graduados. Se determinó el volumen de espuma producido estable después de 20 min; 30mL de las disoluciones fueron emulsionados con 15mL de aceite de canola en una licuadora Osterizer a máxima velocidad por 15s. La emulsión fue vertida en tubos de polietileno graduados y se determinó el volumen total producido, el volumen de la emulsión generada y la estabilidad de la emulsión después de 30 min (Ferreyra *et al.*, 2007).

4.3.6 Capacidad de gelificación

Las muestras fueron ajustadas a una concentración de 50 mg/mL de proteína con un amortiguador de fosfatos 100mM pH 6.0, NaCl 0.6M y EDTA 20mM. La gelificación se llevó a cabo en recipientes cilíndricos de vidrio empleando un proceso en rampas de temperatura: se mantuvieron las muestras a 40°C durante 30 min y posteriormente se incrementó la temperatura 1°C/min hasta alcanzar 75°C en el centro térmico. Se llevó a cabo un choque térmico en un baño con agua y hielo. Los geles se almacenaron 24 horas en refrigeración (4°C) antes de ser evaluados (Rawdkuen *et al.*, 2009; Mahawanich *et al.*, 2010).

4.3.7 Rendimiento de cocción

Se determinó la cantidad de líquido perdido en peso posterior al choque térmico. El rendimiento fue expresado como el porcentaje en peso de gel sólido después de drenar el líquido expulsado (Youssef & Barbut, 2010).

$$\text{Rendimiento de cocción} = \frac{P_g}{P_m} \times 100$$

donde:

P_g es el peso del gel obtenido, después de drenar el líquido expulsado

P_m es el peso de la mezcla de proteína y disoluciones antes de someterla al proceso térmico.

4.3.8 Análisis de Perfil de textura (TPA)

Con los geles obtenidos de medidas estándar 20 mm de altura y 30 mm de diámetro se llevó a cabo el TPA en un texturómetro TA-XT2. Se empleó un émbolo cilíndrico de 10 mm de diámetro, adaptado a una celda de carga de 25 kg, con una altura de compresión de 10 mm y una velocidad de deformación de 1 mm/s. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: dureza (g_f), cohesividad, elasticidad, masticabilidad, fibrosidad, resiliencia y gomosidad (Jafarpour & Gorczyca, 2008).

4.3.9 Perfil de pesos moleculares SDS-PAGE

Muestras de sobrenadantes y precipitados durante los procesos de extracción fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. La preparación de las muestras fue la siguiente: de los sobrenadantes se tomaron 200 μ L, se adicionaron 100 μ L de un amortiguador de Tris-HCl (10.4 g Tris- HCl, 6.9 g glicina, 480 g urea, 1.2 g EDTA por litro) pH 8.0. Muestras sólidas (0.1g de precipitados y geles) se disolvieron en 300 μ L de el mismo amortiguador. A las muestras así preparadas se les adicionaron 700 μ L del amortiguador de carga que contenía β -mercaptoetanol como agente reductor. Las muestras se sometieron a un baño de agua a 90°C durante 10 min. Las muestras se inyectaron en sistemas formados por dos geles, un gel concentrador con un %T de 5% y un gel separador con un 10%. La separación se llevó a cabo a 200mV constantes durante 40 min en un sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Se

llevó a cabo la fijación de las muestras en una disolución metanol 20% y formaldehído 0.5% durante 30 min. La tinción se llevó a cabo con una disolución de 40% metanol, 15% ácido acético y 0.1% azul brillante Coomassie® R-250 (García-Carreño & Haard, 1993; L'Hocine & Pitre, 2016).

4.4 Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los extractos acuosos de orégano sobre las características fisicoquímicas y estructurales del gel cárnico durante su vida útil a bajas temperaturas.

Se realizaron las determinaciones de las siguientes variables:

- Concentración proteica, durante el almacenamiento es posible que inicie un proceso de degradación proteica y la presencia del extracto puede modificar este parámetro.
- pH, nos permite observar los cambios en la generación de ácidos o bases durante el almacenamiento, ya sea debido a enzimas microbianas o endógenas,
- Bases volátiles totales, se llevó a cabo debido a que permite conocer cuantitativamente el total de moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular que se producen durante el almacenamiento,
- Compuestos fenólicos totales, siendo de utilidad comprobar la presencia de éstos (adicionados en el extracto) durante el almacenamiento,
- Presencia de grupos sulfhidrilo libres, debido a que las proteínas tienden a cambiar su conformación espacial al transcurrir el tiempo y utilizan enlaces tipo puente disulfuro para estabilizarse,

- Producción de trimetilamina, producto de la descomposición enzimática del osmo-regulador óxido de trimetilamina,
- Análisis microbiológico, ya que los cambios en pH y producción de bases volátiles puede ser asociado a este parámetro,
- Análisis de perfil de textura, para conocer el efecto del extracto sobre la estructura del gel.

4.4.1 Evaluación del porcentaje en peso de adición.

Al tratarse de un producto dirigido a consumo humano, fue necesario adicionar una cantidad del extracto que haga posible aprovechar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes, esto sin modificar negativamente las propiedades organolépticas del producto. La adición se llevó a cabo de manera directa, los volúmenes de extracto (% en volumen) fueron adicionados a 100g de una disolución del extracto proteico con una concentración de 50mg de proteína/g. Se llevó a cabo una homogenización manual. Para corroborar la homogeneidad en la adición del extracto, se realizaron determinaciones de compuestos fenólicos totales a la mezcla obtenida.

4.4.1.1 Porcentaje máximo.

Para determinarlo, se evaluaron elevadas concentraciones del extracto en el gel cárnico: 5%, 8%, 10% y 12% (5mL, 8mL, 10mL y 12mL respectivamente a 100g de la disolución proteica de concentración

establecida). Se realizó una prueba sensorial afectiva con un panel de 5 jueces no entrenados.

4.4.1.2 Niveles de aplicación.

Se evaluaron concentraciones entre el nivel mínimo y el nivel máximo determinado (de 0% a 5%, figuras 6 y 7). Se determinó la estabilidad de los geles durante 3 semanas de refrigeración (figura 8).



Figura 6 - Disoluciones de extracto de orégano + amortiguador de fosfatos 100mM pH 7.0 NaCl 0.6M, que fueron adicionados al extracto proteico previamente a la cocción.



Figura 7 - Disoluciones proteicas adicionadas con distintos niveles del extracto de orégano.



Figura 8 - Efecto de los niveles adicionados del extracto de orégano sobre la integridad de los geles posterior al almacenamiento en refrigeración.

4.4.2 Almacenamiento en refrigeración.

4.4.2.1 Concentración proteica.

Para la determinación de la concentración proteica se llevó a cabo la técnica descrita en el apartado 4.1.1.5.

4.4.2.2 Determinación de pH.

La preparación de las muestras y la determinación de este parámetro se realizaron de acuerdo a la sección 4.1.1.6.

4.4.2.3 Cuantificación de bases volátiles totales

Se homogeneizaron 25g de los geles con 100mL de agua destilada, posteriormente se filtró con un tamaño de poro de 1.5mm x 1.5mm. Una alícuota de 10mL fue colocada en la parte inferior de una caja Petri junto a 2mL de una disolución saturada de carbonato de potasio anhidro (25g K_2CO_3 en 25mL de agua destilada). En la tapa se colocaron 13 gotas de una disolución saturada de ácido bórico en glicerina (14g H_2BO_3 en 50mL de glicerina) y se cerraron utilizando silicona como sellante del

sistema. Posterior a 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C) las gotas de la tapa se transfirieron a un matraz con ayuda de un gendarme y 50mL de agua destilada. Las muestras y los blancos de reactivos fueron titulados empleando una disolución de HCl 0.01M y como indicador la mezcla Tashiro (0.125g de rojo de metilo en 10mL de NaOH 0.05N, 0.080g de azul de metileno en 90mL de agua destilada). El resultado fue expresado en mg de nitrógeno por 100g de muestra (Liu *et al.*, 2014).

4.4.2.4 Determinación de compuestos fenólicos totales.

El reactivo de Folín-Ciocalteau es empleado en una metodología para determinar la concentración proteica en muestras biológicas, debido a que ciertos aminoácidos hidroxilados son capaces de dar positiva la reacción, por ello se determinó que con una extracción empleando ácido tricloroacético al 2% (TCA 2%) es posible obtener una lectura de los compuestos fenólicos presentes en los geles y disminuir la señal producida por la proteína presente, realizándose la cuantificación en geles con el extracto y sin él. Para la cuantificación en las muestras así preparadas se siguió la metodología señalada en el apartado 4.2.2.

4.4.2.5 Determinación de grupos sulfhidrilo libres.

Se tomó 1mL de una disolución proteica de concentración conocida (5mg/mL). Se adicionaron 9mL de una disolución de urea 8M (480g/L, utilizando como disolvente un amortiguador de pH 8.0, que contenía

Tris-base 10.4g, glicina 6.9g y EDTA 1.2g por litro). Se mantuvieron las muestras en reposo durante 30 min. Se tomaron 3mL e un tubo de 13x100mm y se adicionaron 50 μ L de una disolución de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (100 mg/25mL). Se dejaron reposar los tubos en oscuridad durante 30 min y posteriormente leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412nm.

La concentración de grupos sulfhidrilo fue determinada utilizando la siguiente ecuación (Ellman, 1959; Cortés-Ruiz *et al.*, 2015; Morachis *et al.*, 2015):

$$\mu M - SH / mg \text{ proteína} = \frac{75.53 * Abs_{412nm} * 10}{Concentración \text{ proteica (mg)}}$$

4.4.2.6 Determinación de trimetilamina.

Se homogeneizaron 25 g de muestra con TCA al 2% en una relación 1:2 durante 1 min. La muestra fue centrifugada a 6500g durante 25 min a 4°C. Se determinó el volumen de sobrenadante obtenido. Se colocaron 2mL del sobrenadante en tubos de 20x200mm, junto a 1mL de disolución de formaldehido (10mL de formalina y 40mL de metanol, aforado a 100mL con agua destilada), 10mL de tolueno y 3 mg de carbonato de potasio anhidro. La mezcla fue agitada durante 1 min a velocidad media en vórtex. En tubos de 13x100mm se colocaron 0.5g de sulfato de sodio anhidro y se decantó la fase orgánica de los primeros tubos en éstos. 1.5mL de la fase orgánica se mezclaron con 1.5mL de la disolución de trabajo de ácido pícrico (disolución madre: 2g de ácido pícrico en 100mL de tolueno; disolución de trabajo: 1mL de la disolución madre llevada a

100mL con tolueno seco). Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410nm y comparadas contra una curva estándar de clorhidrato de trimetilamina 0.1 – 1.5 mg (disolución madre de trimetilamina: 0.682g de clorhidrato de trimetilamina, 1mL de ácido clorhídrico concentrado, aforar a 100mL con agua destilada) (Dyer, 1945; Zhu et al., 2016).

4.4.2.7 Perfil de textura.

El análisis de TPA se obtuvo siguiendo la metodología señalada en el apartado 4.4.8.

4.4.2.8 Análisis microbiológico.

Se llevó a cabo la determinación de los siguientes parámetros: mesófilos aerobios (de acuerdo al apartado 4.2.1), coliformes totales por vaciado en placa (siguiendo lo señalado en el apartado 4.2.3) y la determinación de hongos y levaduras (metodología descrita en el apartado 4.2.2).

5 Resultados y discusión.

5.1 Evaluación de las características fisicoquímicas y estructurales del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Los valores obtenidos concuerdan con los reportados para la especie (Tabla 1), de acuerdo a los valores descritos por Luna-Raya *et al.* (2006), obtenidos de la Tabla de Composición de alimentos de América Latina proporcionados por la FAO. El porcentaje de proteína (13.2%) se encuentra incluido en el porcentaje de nitrógeno total (20.5%), por lo cual el porcentaje de compuestos nitrogenados no proteicos constituyen aproximadamente el 7.3%; en este grupo se incluyen amoniaco, productos de descarboxilación de aminoácidos, así como el óxido de triemtilamina, que es un osmo-regulador presente en especies marinas, que han sido empleados como indicador de calidad en este tipo de productos (Zhu *et al.*, 2016)

Tabla 1 - Análisis bromatológico del manto de calamar gigante.
Análisis Bromatológico

	Valores obtenidos experimentalmente	Valores descritos por Luna-Raya <i>et al.</i> , 2006
Humedad	74% ± 1.2	81.0%
Cenizas	0.7% ± 0.05	1.5%
Extracto Etéreo	1.2% ± 0.3	1.1%
Nitrógeno Total	20.5% ± 3	16.4%
Proteína	13.2% ± 2.1	n/d
pH	6.6 ± 0.25	n/d

n/d = no descrito

Si bien en la norma oficial mexicana de referencia (NOM-242-SSA1-2010) no existen parámetros específicos para mesófilos aerobios, este valor se ha convertido en un indicador de las características iniciales de este tipo de productos. Se realizó la determinación de hongos y levaduras, así como coliformes totales en placa, para verificar el manejo higiénico de la materia prima (Tabla 2). La norma de referencia menciona como pruebas estándar coliformes totales y fecales por la técnica del número más probable (NMP), presencia de *Salmonella* spp. y *S. aureus*; la materia prima cumple con los parámetros establecidos por la norma.

Tabla 2 - Análisis microbiológico del manto de calamar gigante.

Análisis Microbiológico	
Mesófilos Aerobios	1.2 x 10 ³ ufc/g
Hongos y Levaduras	<10 ufc/g
Coliformes Totales en Placa	<15 ufc/g
Coliformes Totales (NMP)	<20 NMP/g
Coliformes Fecales (NMP)	<20 NMP/g
<i>Salmonella</i> spp	Ausente en 25g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente en 25g

5.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de extractos acuosos de orégano (*Origanum vulgare* L.)

Se evaluaron combinaciones de tiempos de extracción y de relaciones orégano-agua con el objetivo de establecer las condiciones que, además de reducir los tiempos y uso de materia prima, permitieran obtener extractos de características similares a aquellos

en los que se emplearon mayores cantidades de orégano o un mayor tiempo de extracción. Como se observa en la Tabla 3, a partir de una relación orégano agua 1:15 y un tiempo de extracción de 15 min no existe diferencia significativa respecto a la utilización de un mayor tiempo de extracción o una mayor relación orégano-agua. Empleando estas condiciones el extracto obtenido contenía 1328 ± 14 μg de ácido gálico/mL de extracto, comparado con 2080 ± 23 μg de ácido caféico/mL de extracto obtenido por Gómez-Estaca *et al.* (2009); esta diferencia puede deberse a la temperatura de extracción, ya que se llevó a cabo el proceso a 45°C , mientras que en el presente trabajo se realizó a 20°C .

En extractos acuosos a partir de *Origanum vulgare* L., se han encontrado componentes tales como ácido rosmarínico, ácido gálico y ácido protocatecuico, así como compuestos derivados de ácido hidroxibenzóico, derivados de ácido cafeico y varios flavonoides (Gómez-Estaca *et al.*, 2009).

Tabla 3 - Eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos totales, resultados presentados como microgramos equivalentes de ácido gálico por 5 microlitros de extracto.

Relación orégano/agua gramo/mL	Tiempo de Extracción	
	15 min	30 min
1/10	36.28 ± 0.74 a	39.16 ± 2.44 a
1/15	26.52 ± 1.29 b	26.50 ± 1.22 b
1/20	24.02 ± 0.88 b	24.78 ± 0.92 b

Letras distintas señalan diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

Si bien, se han encontrado correlaciones entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en especias, ésta depende del tipo de

compuestos que contienen dichos materiales vegetales, por ello es necesario realizar este tipo de análisis al modificar las condiciones de extracción. En la Tabla 4 se observa la capacidad antioxidante del extracto seleccionado.

Tabla 4 - Actividad antioxidante de 10µL del extracto seleccionado, representada como porcentaje de inhibición de los radicales ABTS•+ (radical monocatiónico del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y DPPH• (radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo).

Método	Porcentaje de inhibición
Inhibición del radical catiónico ABTS•+	85% ± 4.7
Inhibición del radical DPPH•	75% ± 7.3

De la misma forma, se evaluó la capacidad antimicrobiana del extracto seleccionado contra microorganismos patógenos de importancia alimentaria, los resultados fueron los siguientes:



S. aureus ATCC 25923

E. coli ATCC 25922

Figura 9 A – Halos de inhibición de *S. aureus*, con un diámetro de 17 mm.

Figura 9 B – Halos de inhibición de *E. coli*, con un diámetro de 9 mm.



Salmonella typhimurium

Figura 9 C – Halos de inhibición de *Salmonella typhimurium*, con un diámetro de 5 mm.

El extracto obtenido presenta capacidad antimicrobiana evidente frente a *S. aureus* (Figura 9 A) y *E. coli* (Figura 9 B), concordando con lo reportado por Gómez-Sánchez en 2009 y Rodríguez-Sauceda en 2011; sin embargo, no fue evidente frente a *Salmonella* (Figura 9 C). Cabe mencionar que los resultados de esta prueba son dependientes de la concentración de compuestos activos en el extracto y la cantidad de microorganismos contra los que se realiza la prueba. Para los casos estudiados, se utilizaron 10 μ L de extracto (equivalentes a aproximadamente 26.5 μ g equivalentes de ácido gálico) contra una concentración de microorganismos de 1.5 x 10⁸ UFC/mL. El hecho de no presentar evidente actividad antimicrobiana contra una cepa del género *Salmonella* bajo las condiciones de estudio, puede indicar que es requerida una mayor concentración del extracto para lograr inhibir una población de esa magnitud, o bien, reducir la carga microbiana en el inóculo para observar actividad antimicrobiana con esa misma cantidad de extracto de orégano (Anexo 8.2).

5.3 Desarrollo del gel cárnico a partir del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Durante las etapas de precipitación en los procesos B y C se utilizó la formación de espuma como método adicional de desnaturalización. Si bien Sánchez-Alonso (2007) lo menciona como una desventaja tecnológica debido a la formación de burbujas, se observa que esta etapa del proceso impactó en la presencia de péptidos presentes en el sobrenadante posterior a la centrifugación. Esto es visible en la electroforesis (Figura 10) en donde, en la etapa de precipitación del tratamiento D es visible la presencia de miosina, paramiosina y actina en el sobrenadante (posterior a la centrifugación), mientras que en los procesos B y C no se observan bandas de bajos péptidos. Esto sugiere que la formación de espuma desnaturaliza dichas fracciones proteicas y son incorporadas al precipitado resultante, teniendo así una menor pérdida de proteínas de interés, como es el caso de miosina, paramiosina y actina.

Figura 10 - SDS-PAGE de geles obtenidos de los extractos proteicos, sobrenadantes y precipitados de los procesos de extracción.

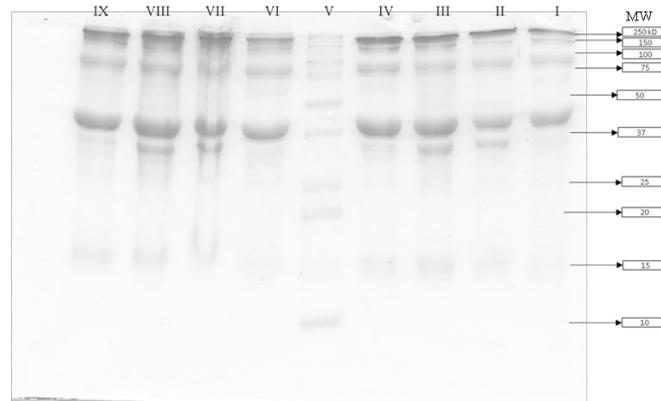


Figura 10 A - SDS-PAGE de extractos proteicos y geles. I. Extracto proteico del proceso A, II. Extracto proteico del proceso B, III. Extracto proteico del proceso C, IV. Extracto proteico del proceso D, V. Marcador de pesos moleculares (MW), VI. Gel obtenido del extracto A, VII. Gel obtenido del extracto B, VIII. Gel obtenido del extracto C y IX. Gel obtenido del extracto D.

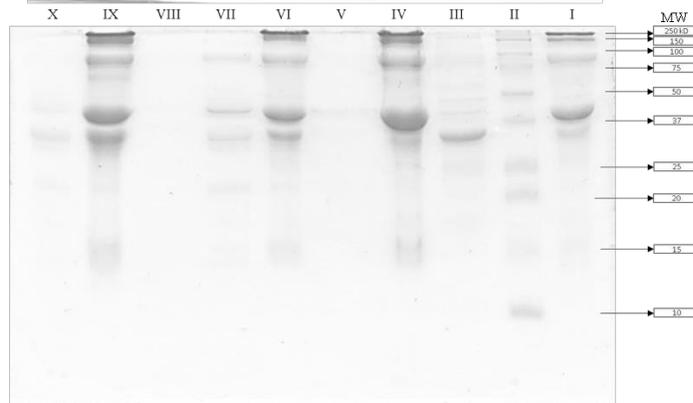


Figura 10 B - SDS-PAGE de sobrenadantes y precipitados de los procesos de extracción. I. Proteína de manto de calamar gigante, II. Marcador de pesos moleculares (MW), III. Sobrenadante de la precipitación isoelectrica del proceso D, IV. Precipitado obtenido de la precipitación isoelectrica del proceso D, V. Sobrenadante de la precipitación isoelectrica del proceso B, VI. Precipitado obtenido de la precipitación isoelectrica del proceso B, VII. Sobrenadante de la neutralización del proceso B, VIII. Sobrenadante de la precipitación isoelectrica del proceso C, IX. Precipitado obtenido de la precipitación isoelectrica del proceso C, X. Sobrenadante de la neutralización del proceso C.

Existe diferencia significativa entre la concentración proteica de los extractos obtenidos, siendo el proceso D aquel con una menor concentración y los procesos A, B y C aquellos con una concentración mayor (Tabla 5). En el proceso A es posible que aún exista una concentración considerable de proteínas sarcoplásmicas. En cuanto a los procesos B y C, el proceso de solubilización-precipitación implica un cambio en la confirmación de las proteínas, pudiendo exponerse grupos no polares, conllevando a la formación de agregados poco solubles. El proceso D, sin embargo, pudo seguir un proceso de cambio de conformación distinto, ya que, si bien se formaron agregados durante la precipitación, al neutralizarse estos se disolvieron, lo cual puede significar una exposición de grupos polares, por lo tanto, una mayor interacción agua-proteína y un incremento en la cantidad de agua en el

extracto proteico respecto a la proteína presente, y por ello una menor concentración relativa.

Tabla 5 – Propiedades funcionales de los concentrados proteicos.

Proceso	Concentración proteica (mg de proteína/g)	Solubilidad (Porcentaje de proteína soluble)	Capacidad de Retención de Agua (mL de NaCl 0.6M retenido por g)	Rendimiento de cocción (porcentaje en peso)
A	79.01 ± 2.9 ^a	12.33 ± 0.28 ^b	0.333 ± 0.0251 ^a	75.4 ± 0.89 ^a
B	89.69 ± 31.4 ^a	7.04 ± 0.83 ^a	0.422 ± 0.0025 ^b	98.51 ± 0.34 ^d
C	69.92 ± 15.7 ^a	6.99 ± 0.66 ^a	0.424 ± 0.0071 ^b	81.92 ± 0.56 ^b
D	55.61 ± 4.3 ^a	8.2 ± 1.67 ^a	0.723 ± 0.0305 ^c	95.7 ± 0.35 ^c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

En la Tabla 5, se observan los valores de solubilidad de los procesos comparados con el proceso A. Los procesos B, C y D probablemente presentan un menor valor de solubilidad debido al proceso de extracción, ya que son descartados los volúmenes de agua utilizados para las extracciones. Así mismo, es posible que los procesos de solubilización en los tratamientos B y C provoquen la exposición de grupos hidrófobos, lo cual genera una menor interacción agua-proteína y, por consiguiente, una disminución en el valor de solubilidad. Cortés-Ruiz *et al.* (2008) menciona que las proteínas deben ser suficientemente solubles para interactuar con otros componentes, como agua y grasa, y con ellas mismas, lo cual puede correlacionarse a una posibilidad de aplicación tecnológica, como capacidad emulsionante y gelificante. Los resultados obtenidos se pueden comparar a los obtenidos por Galvez-Rogel (2012), quien encontró un menor valor de solubilidad en extractos proteicos obtenidos por modificación de pH respecto a un concentrado a partir de manto de calamar sin dicho procedimiento.

En cuanto a capacidad de retención de agua (CRA) no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos B y C, pero si con los otros tratamientos. En este aspecto, es probable que el proceso de solubilización ácida o alcalina (en los procesos B y C) impacte en la CRA, ya que se observó la formación de agregados de aproximadamente 2mm de diámetro durante la precipitación; por otra parte, al llevar a cabo la precipitación en el proceso D se observaron agregados de menor tamaño (<0.5mm de diámetro) por lo cual se presume que el tamaño de los agregados formados impacta en la CRA. Existe diferencia significativa entre los 4 tratamientos en el rendimiento de cocción, siendo aquel con un valor mayor el proceso B, seguido del proceso D y el proceso C; esto puede deberse al tipo de cambios conformacionales que se dan durante los procesos de solubilización y precipitación.

Tabla 6 - Actividad espumante de los extractos obtenidos (20°C).

pH\Proceso	A ^a	B ^a	C ^a	D ^a
3 ^b	131.5 ± 3.2 ^b	125.1 ± 2.8 ^{ab}	125.9 ± 3.2 ^{ab}	125.9 ± 3.2 ^{ab}
4 ^a	122.2 ± 5.5 ^{ab}	123.1 ± 0.9 ^{ab}	123.1 ± 1.6 ^{ab}	116.6 ± 9.6 ^a
5 ^{ab}	125.9 ± 3.2 ^{ab}	127.7 ± 5.5 ^{ab}	122.8 ± 1.1 ^{ab}	128.1 ± 0.7 ^{ab}
6 ^b	131.4 ± 3.2 ^b	127.4 ± 1.7 ^{ab}	125.9 ± 3.2 ^{ab}	128.8 ± 4.0 ^{ab}
7 ^b	125.9 ± 3.2 ^{ab}	125.9 ± 3.2 ^{ab}	124.8 ± 5.1 ^{ab}	132.2 ± 1.9 ^b
8 ^b	127.7 ± 5.5 ^{ab}	127.1 ± 4.2 ^{ab}	127.7 ± 5.5 ^{ab}	124.8 ± 9.7 ^{ab}
9 ^b	129.6 ± 3.2 ^{ab}	128.8 ± 1.1 ^{ab}	131.8 ± 3.5 ^b	134.2 ± 0.8 ^b

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), entre distintos pH, distintos procesos y combinaciones proceso-pH.

Entre los pH 6 y 7 los tratamientos A y D presentan los valores mayores en capacidad espumante (Tabla 6), esto puede deberse a que al exponerse grupos hidrófobos en los tratamientos B y C existen fuerzas de atracción entre las

proteínas y entonces se favorece coalescencia, lo que genera inestabilidad del sistema y ruptura de la espuma generada.

Tabla 7 – Capacidad emulsionante: porcentaje de integración de agua (20°C).

pH\Proceso	A ^d	B ^c	C ^b	D ^a
3 ^a	67.27 ± 1.055 ^{abc}	93.98 ± 1.14 ^{de}	60.58 ± 1.03 ^{ab}	50.56 ± 0.985 ^a
4 ^a	67.27 ± 1.055 ^{abc}	67.27 ± 1.055 ^{abc}	67.27 ± 1.055 ^{abc}	67.27 ± 1.055 ^{abc}
5 ^c	67.27 ± 1.055 ^{abc}	87.31 ± 1.121 ^{cde}	80.63 ± 1.101 ^{bcde}	67.27 ± 1.055 ^{abc}
6 ^b	80.63 ± 1.101 ^{bde}	67.27 ± 1.055 ^{abc}	73.95 ± 1.08 ^{bcd}	67.27 ± 1.055 ^{abc}
7 ^c	87.30 ± 1.121 ^{cde}	67.27 ± 1.055 ^{abc}	80.63 ± 1.101 ^{bcde}	67.27 ± 1.055 ^{abc}
8 ^d	100.66 ± 1.157 ^e	67.27 ± 1.055 ^{abc}	70.61 ± 1.068 ^{abc}	73.95 ± 1.08 ^{bcd}
9 ^e	134.04 ± 1.228 ^f	100.66 ± 1.157 ^e	70.61 ± 1.068 ^{abc}	73.95 ± 1.08 ^{bcd}

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), entre distintos pH, distintos procesos y combinaciones proceso-pH.

Tabla 8 – Capacidad emulsionante: estabilidad de la emulsión 30 min (20°C).

pH\Proceso	A ^b	B ^c	C ^a	D ^d
3	88.64 ± 1.12 ^{def}	93.75 ± 1.14 ^{ef}	63.09 ± 1.04 ^{ab}	89.53 ± 1.12 ^{def}
4	84.63 ± 1.11 ^{cdef}	88.64 ± 1.12 ^{def}	60.58 ± 1.03 ^{ab}	80.63 ± 1.10 ^{cd}
5	84.63 ± 1.11 ^{cdef}	89.93 ± 1.13 ^{def}	59.84 ± 1.02 ^{ab}	88.64 ± 1.12 ^{def}
6	78.40 ± 1.09 ^{cd}	88.64 ± 1.12 ^{def}	58.27 ± 1.02 ^a	88.64 ± 1.12 ^{def}
7	86.35 ± 1.11 ^{def}	80.63 ± 1.10 ^{cd}	63.55 ± 1.04 ^{ab}	88.64 ± 1.12 ^{def}
8	83.97 ± 1.11 ^{cde}	80.63 ± 1.10 ^{cd}	59.41 ± 1.02 ^{ab}	89.10 ± 1.12 ^{def}
9	72.04 ± 1.07 ^{bc}	83.97 ± 1.11 ^{cde}	86.91 ± 1.12 ^{def}	96.81 ± 1.14 ^f

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), entre distintos pH, distintos procesos y combinaciones proceso-pH.

Se encontraron diferencias significativas entre los concentrados (Tabla 7) en cuanto a porcentaje de aceite incorporado a la emulsión, siendo el tratamiento A aquel con una mayor incorporación (realizando la comparación entre tratamientos) pudiendo deberse a la presencia de proteínas sarcoplásmicas (o globulares), ya que éstas se

encuentran en forma nativa, mientras que el tratamiento D presenta el menor valor en cuanto a este parámetro, posiblemente debido a la exposición de grupos polares durante el proceso de extracción, lo que limitaría las interacciones grasa-proteína. En la Tabla 8 se presentan los valores de la estabilidad de las emulsiones formadas, siendo el concentrado C aquel que presentó una menor estabilidad en las emulsiones producidas a distintos pH, caso opuesto al tratamiento D (Figura 11), en el cual las emulsiones producidas a pH entre 5 y 8 tiene una estabilidad superior al 90%, lo cual lo convertiría en una opción viable para la producción de emulsiones, ya que al desarrollarse un alimento de este tipo (con o sin tratamiento térmico), la vida útil es influenciada principalmente por la estabilidad de la emulsión y, si la proteína presenta una estabilidad alta a través del tiempo, la adición de estabilizantes puede realizarse en menor medida, conllevando así un beneficio económico.



Figura 11 – Emulsiones generadas a partir del tratamiento D a distintos valores de pH a 20°C.

Tabla 9 - Perfil de textura de los geles obtenidos a partir de los concentrados proteicos. Af, Bf, Cf y Df indican las muestras al final del periodo de almacenamiento (21 días)

Muestra	Dureza (g _f)	Cohesividad	Elasticidad	Masticabilidad	Fibrosidad	Resiliencia	Gomosidad
A	0.121±0.058 ^a	0.478±0.222 ^{ab}	2.094±1.068 ^a	0.105±0.053 ^a	15.986±6.014 ^{cd}	2.107±1.633 ^b	0.051±0.009 ^a
Af	0.175±0.054 ^a	0.552±0.135 ^{ab}	0.958±0.051 ^{ab}	0.089±0.026 ^a	6.233±0.722 ^{ab}	0.366±0.075 ^{ab}	0.095±0.033 ^a
B	24.791±1.378 ^c	0.811±0.025 ^b	0.372±0.007 ^b	7.507±0.799 ^b	33.936±0.602 ^f	0.508±0.005 ^{ab}	20.147±1.739 ^c
Bf	0.391±0.092 ^a	0.719±0.041 ^{ab}	0.912±0.018 ^a	0.254±0.051 ^a	5.115±0.464 ^a	0.294±0.021 ^{ab}	0.278±0.053 ^a
C	22.548±1.327 ^b	0.562±0.374 ^{ab}	0.418±0.012 ^a	5.187±1.521 ^b	25.547±1.485 ^e	0.376±0.259 ^{ab}	12.175±7.707 ^b
Cf	0.062±0.01 ^a	0.246±0.029 ^a	0.761±0.121 ^a	0.011±0.002 ^a	12.104±0.97 ^{bc}	0.064±0.006 ^a	0.015±0.001 ^a
D	0.262±0.022 ^a	0.431±0.043 ^{ab}	0.829±0.152 ^a	0.096±0.036 ^a	20.611±1.542 ^{de}	0.23±0.23 ^a	0.114±0.021 ^a
Df	0.120±0.006 ^a	0.293±0.124 ^a	1.131±0.332 ^{ab}	0.038±0.018 ^a	10.606±1.206 ^{abc}	1.00±0.804 ^{ab}	0.035±0.016 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las muestras (p<0.05).

Dentro de las características analizadas (Tabla 9), se observa que los geles obtenidos del concentrado B (previamente al almacenamiento) presentan valores mayores en las características de dureza y fibrosidad; los geles obtenidos a partir del tratamiento C (previamente al almacenamiento) no presentan diferencias significativas con el tratamiento B en cuanto a gomosis. Esto puede deberse a las modificaciones conformacionales (separación de las hélices α de la miosina, procesos de formación-ruptura de puentes de hidrógeno inter e intra moleculares, desaminación de aminoácidos-en medio alcalino-, así como ruptura y formación de puentes disulfuro) que sufren las proteínas al ser solubilizadas y posteriormente insolubilizadas, efecto que no se observa en los tratamientos A y D. De las características analizadas, en elasticidad y resiliencia, el tratamiento A presenta los valores mayores (previamente al almacenamiento), esto es posiblemente debido a que estas características están relacionadas a una proteína existente en el calamar gigante y en general, en los moluscos, la paramiosina que ha sido reportada como

la proteína responsable de las características flexibles y elásticas de geles elaborados a partir de las especies que la contienen.

Posterior al almacenamiento, no existe diferencia entre los tratamientos en los parámetros de dureza, elasticidad, masticabilidad y gomosidad, esto indica que independientemente del proceso de extracción y las propiedades iniciales, la pérdida de propiedades estructurales podría seguir un mecanismo similar, es decir, actividad enzimática endógena. Esto está apoyado por los resultados microbiológicos (figuras 12 y 13), en los que el tratamiento C presenta una menor carga microbiana que el resto de los tratamientos al final del periodo de almacenamiento.

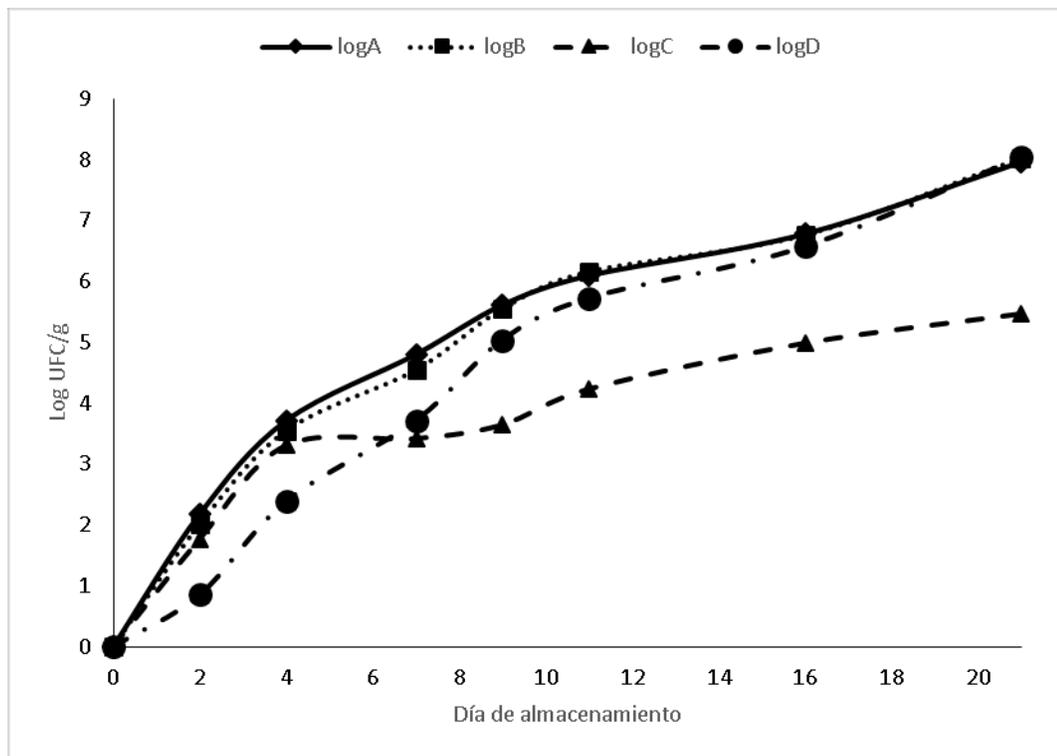


Figura 12 – Cuenta en placa de mesófilos aerobios de los geles obtenidos de los métodos de extracción.

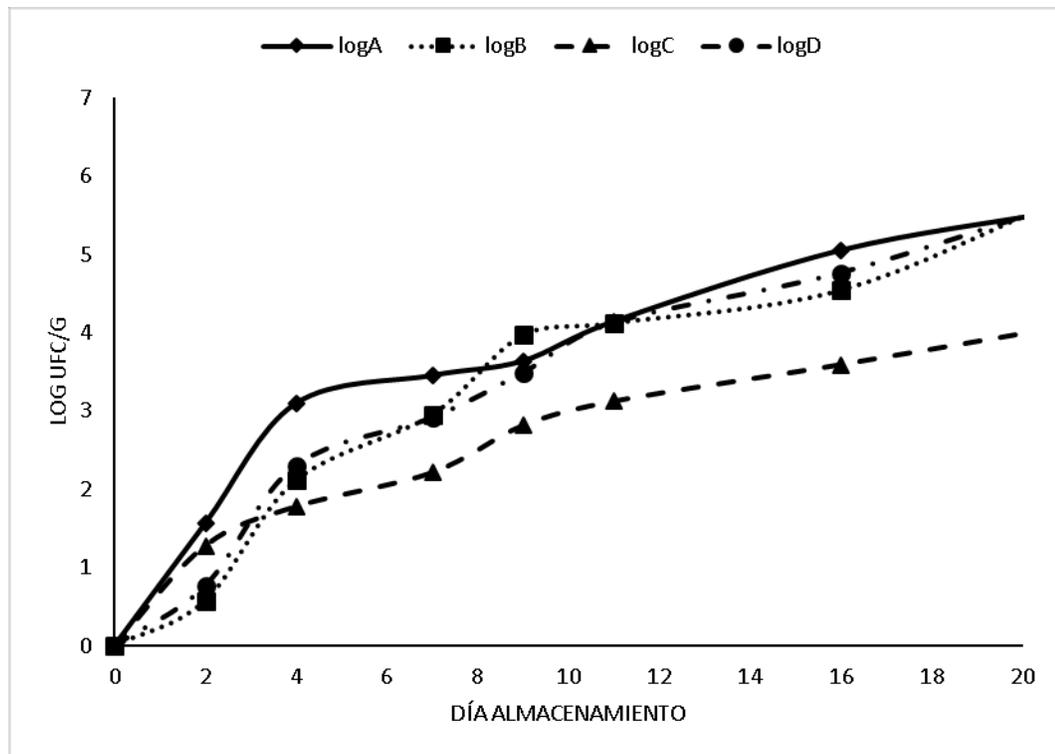


Figura 13 – Cuenta de coliformes totales en placa de los gels obtenidos de los métodos de extracción.

Es observable que el tratamiento D, si bien tiene un comportamiento similar a los tratamientos A y B, presenta una diferencia de una unidad logarítmica al día 7 de almacenamiento respecto a las mencionadas. Por otro lado, el tratamiento C presenta una visible diferencia respecto a los otros tratamientos a partir del día 10 de almacenamiento, esto puede deberse a que, en medio ácido, algunos péptidos son liberados de la cadena proteica. Este tipo de péptidos han demostrado poseer actividad antimicrobiana de acuerdo con Mulero-Cánovas *et al.* (2011), que, si bien usualmente son liberados por acción enzimática, también pueden ser liberados por métodos químicos (Kannan *et al.*, 2012).

5.4 Evaluación del efecto del extracto sobre el gel cárnico.

La concentración proteica fue determinada por el método de biuret. Debido a que los geles se desarrollaron con una concentración inicial de 50mg/g de proteína (figura 14), el hecho de que la concentración inicial en los geles son distintas sugieren un proceso de integración de agua a la matriz distinto (figura 16), siendo aquel gel que incorpora una mayor cantidad de agua aquel con una menor concentración proteica por gramo (gel S, sin orégano), mientras que aquel con una concentración proteica mayor incluye una porción menor de agua al gel, o dicho de otra forma, expulsa una mayor cantidad de agua posterior al choque térmico. Posteriormente existen incrementos graduales en la cantidad de proteína por gramo de gel, esto se debe a que durante el almacenamiento la matriz continúa expulsando agua (figura 15), y ya que para el análisis se toman fragmentos del gel (sin tomar en cuenta el líquido expulsado) existe este tipo de comportamiento en los datos experimentales.



Figura 14 – Geles obtenidos del proceso de extracción B, sin extracto (izquierda) y con extracto (derecha)

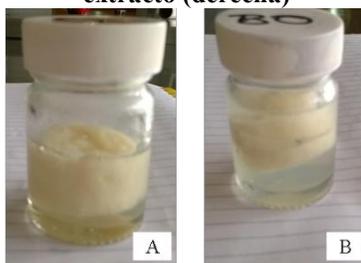


Figura 15 – Expulsión de agua de los geles durante el almacenamiento. A: apariencia durante los primeros 12 días de almacenamiento; B: apariencia a partir del día 12 de almacenamiento.

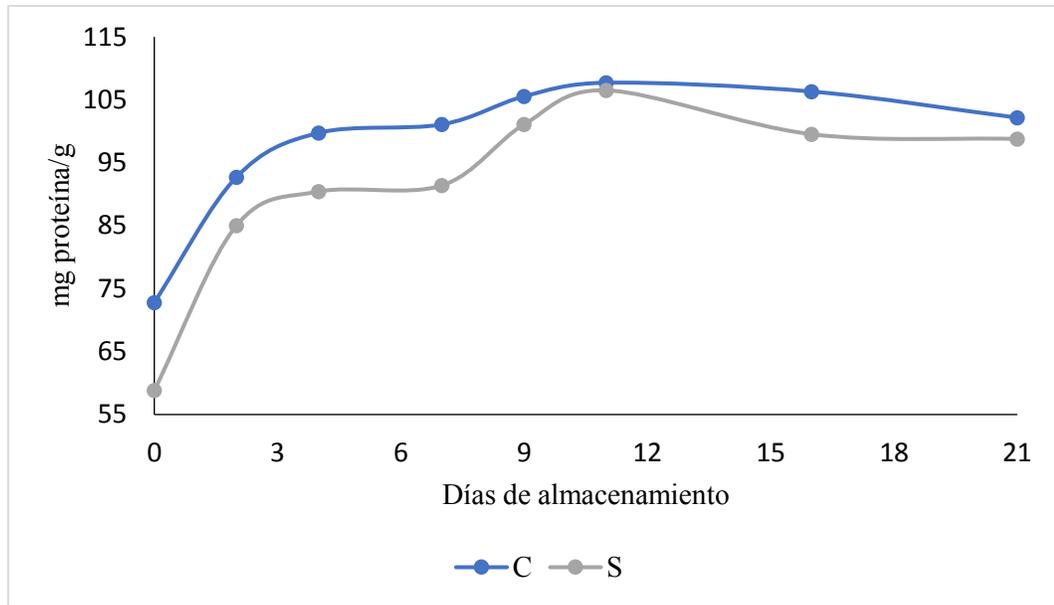


Figura 16 – Concentración proteica del gel adicionado con extracto (C) y el gel sin extracto (S) almacenados a 4°C.

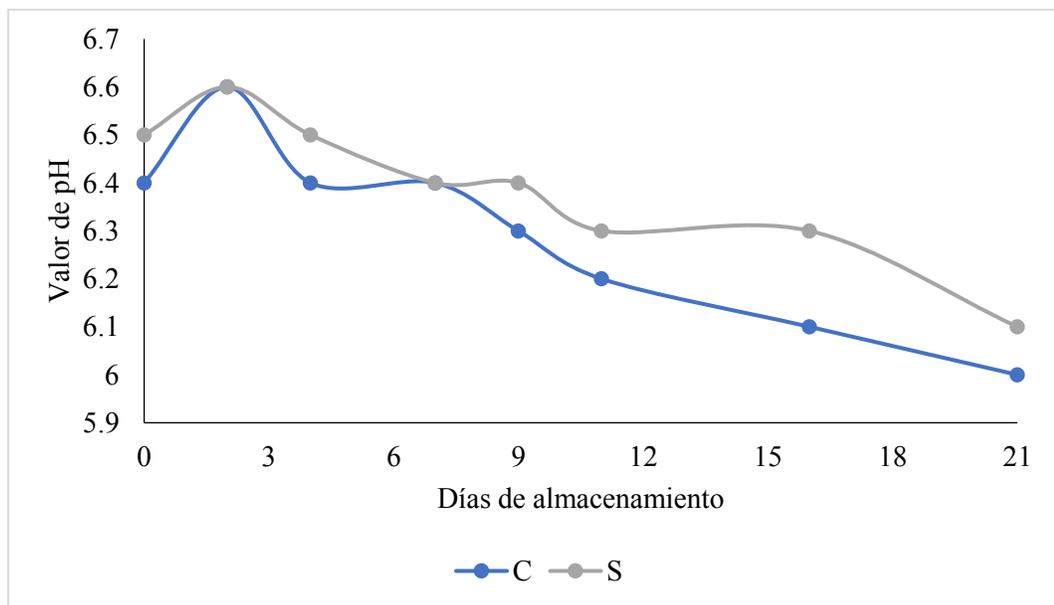


Figura 17 – Valor de pH de las muestras con extracto y sin extracto durante el almacenamiento a 4°C.

Los valores de pH de las muestras presentan variaciones típicas de este tipo de productos (figura 17). La disminución en el pH de ambas muestras puede deberse a varios factores, entre ellos la desaminación de algunos aminoácidos provocada por microorganismos, este fenómeno coadyuva a la generación de ácidos orgánicos

derivados, disminuyendo así el pH de las muestras. Este proceso también tiene por consecuencia la generación de amoníaco y otras bases nitrogenadas de bajo peso molecular, denominadas bases volátiles totales (figura 18). Este tipo de compuestos son los responsables del olor típico de los productos marinos y acuícolas, además, en altas concentraciones producen sabores desagradables. La producción inicial de estos compuestos se debe principalmente a enzimas endógenas, mientras que su producción en etapas avanzadas de almacenamiento se debe a enzimas de origen microbiano.

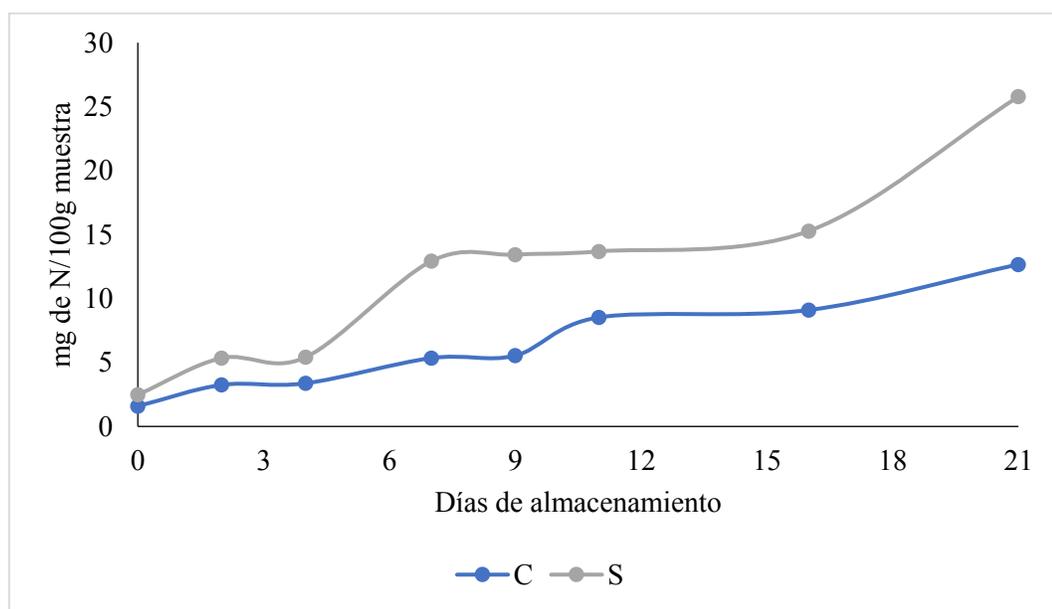


Figura 18 – Producción de bases volátiles totales en los geles adicionados o no con el extracto durante el periodo de almacenamiento a 4°C.

La trimetilamina pertenece a este grupo de compuestos, ésta es producida al reducir el óxido de trimetilamina, principalmente por vías enzimáticas. El óxido de trimetilamina tiene función osmoreguladora en los organismos vivos. La producción está sujeta al tipo de especie cárnica (generalmente se encuentra en proporciones detectables en especies marinas) por enzimas propias de los

organismos y a la actividad antimicrobiana postmortem. En productos procesados térmicamente, si bien existe desnaturalización de las enzimas, siguen presentando actividad durante los primeros días de almacenamiento. Posterior a la proliferación microbiana, las enzimas exógenas son las responsables de la producción mayoritaria de este compuesto. A partir de día 8 de almacenamiento (figura 19) comienza un incremento en ambos tratamientos, sin embargo a partir de día 10 el gel sin extracto presenta incrementos mayores respecto al gel con el extracto adicionado.

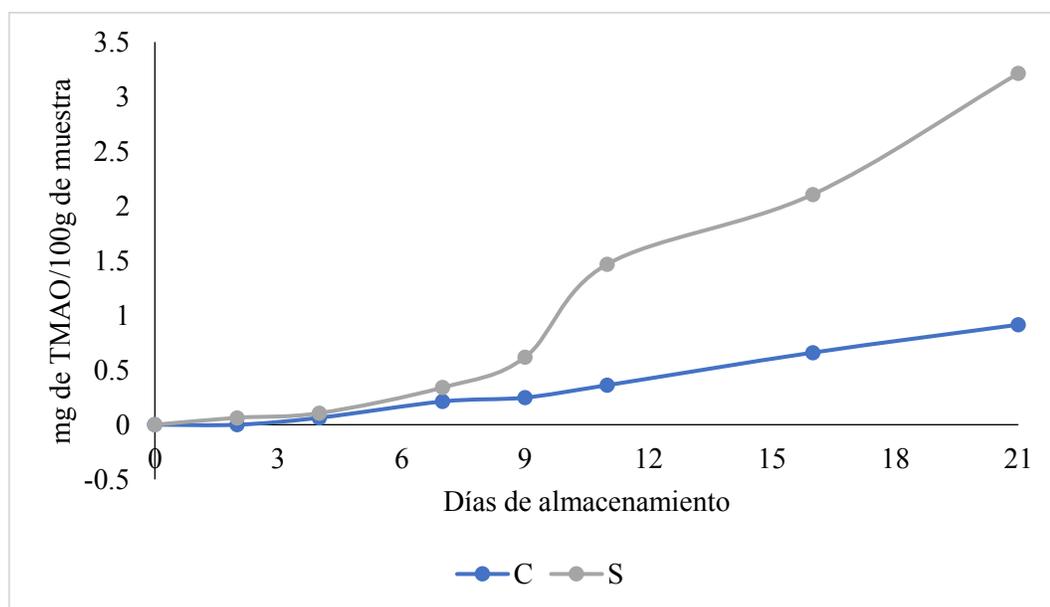


Figura 19 – Producción de trimetilamina en los geles adicionados o no con el extracto durante el periodo de almacenamiento a 4°C.

Es observable el incremento en la producción de estos compuestos (figuras 18 y 19) a partir del día 8 de almacenamiento, concordando con el incremento en la cuenta microbiológica sobre 5 unidades logarítmicas (figura 20), que si bien es una cuenta elevada, no constituye propiamente un riesgo para el consumo humano. Los

límites aceptables en el contenido de bases volátiles y de trimetilamina no son superados en el día final de almacenamiento.

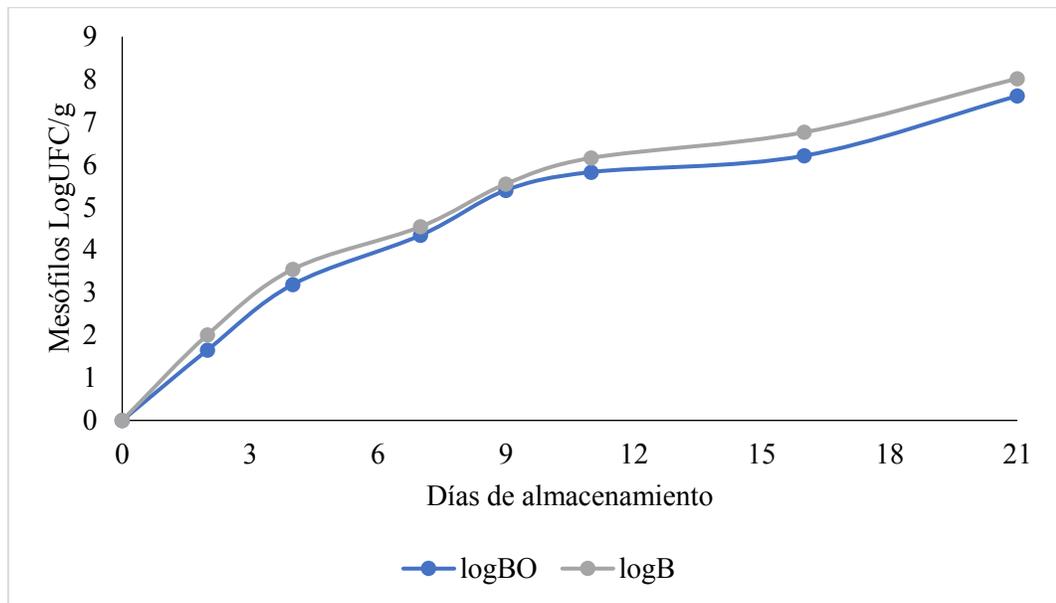


Figura 20 – Cuenta en placa de mesófilos aerobios del gel adicionado con extracto y el control durante el almacenamiento a 4°C.

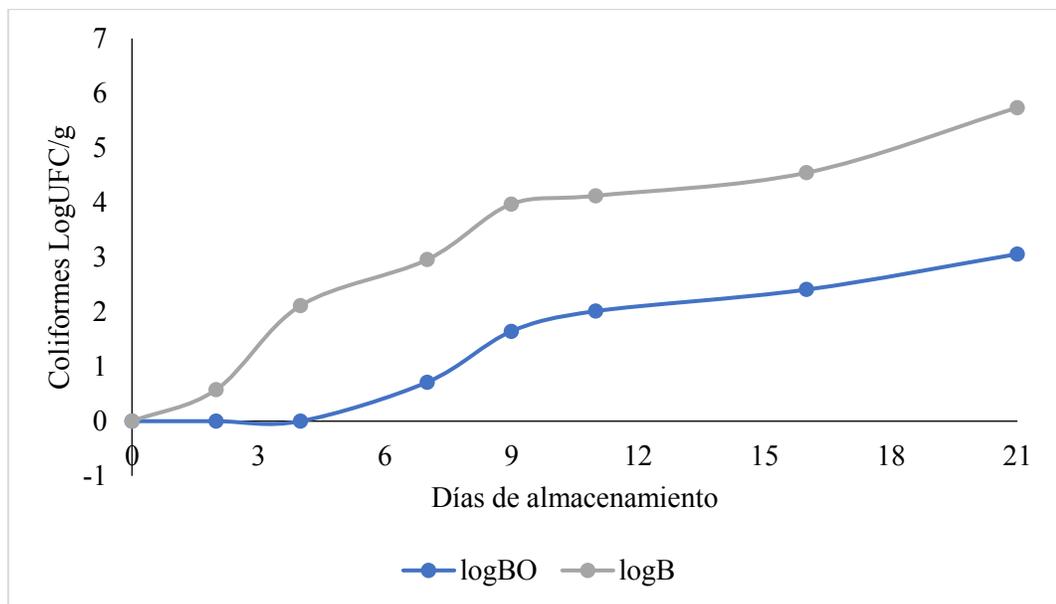


Figura 21 – Coliformes totales en placa del gel adicionado con extracto y el control durante el periodo de almacenamiento a 4°C.

Al adicionar un extracto que contiene compuestos fenólicos totales (CFT), es útil saber cómo se comportan este tipo de componentes. Por ello se realizó la cuantificación de ellos en los geles, aquellos a los que se les adicionó el extracto y a los que no. Se puede observar que existe una disminución continua de CFT hasta el día 17 de almacenamiento, que puede estar relacionada a los procesos de degradación que ocurren naturalmente en los compuestos de origen fenólico, y posteriormente hay un incremento (figura 22), que puede estar relacionado con la degradación microbiana-enzimática de las proteínas, liberándose péptidos o aminoácidos que, si son solubles en medio ácido y presentan aminoácidos con grupos hidroxilo reactivos, dan positiva la reacción al complejo de Folín.

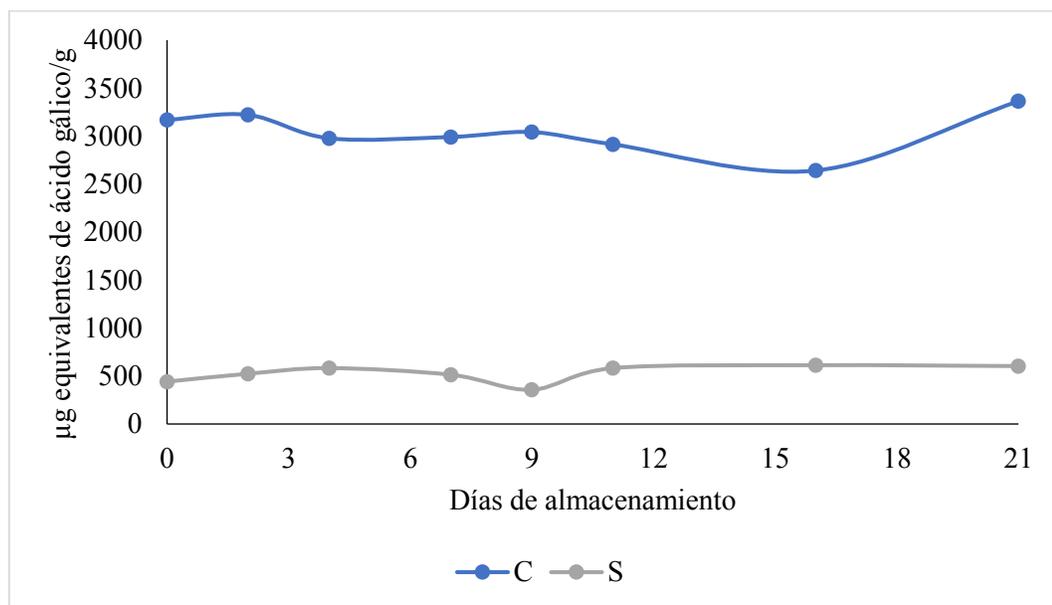


Figura 22 – Compuestos fenólicos totales presentes en los geles adicionados o no con el extracto durante el almacenamiento a 4°C.

La disminución continua de en la concentración de este tipo de compuestos puede deberse a que están actuando como agentes antimicrobianos, por lo que las moléculas son “utilizadas” o “gastadas” para cumplir ese propósito. El incremento

de proteínas solubles en ácido se presume ya que, durante la hidrólisis causada por microorganismos, péptidos de bajo peso molecular son liberados y éstos presentan una mayor solubilidad en medios ácidos (como la disolución de TCA al 2% utilizada para extraer los CFT) respecto a las proteínas de las que provienen.

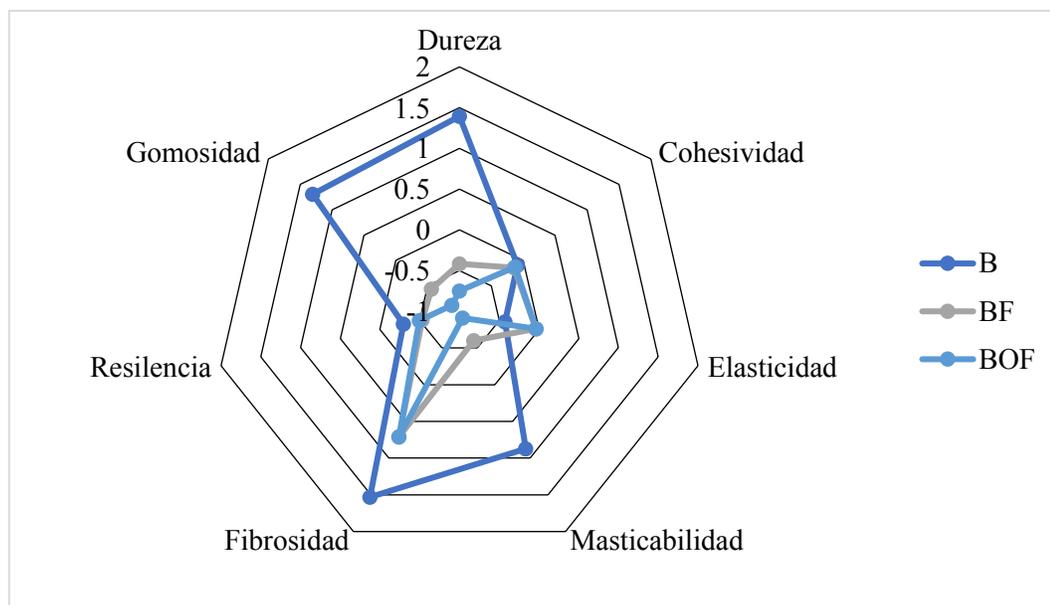


Figura 23 – Perfil de textura de la muestra antes del almacenamiento (B), posterior al almacenamiento sin extracto (BF) y posterior al almacenamiento con extracto (BOF), ambos a 4°C.

Al llevar a cabo el TPA (Figura 23) en los geles antes (B) y después del almacenamiento (con extracto BOF y sin extracto BF) es posible observar que, si bien no existe diferencia significativa entre las muestras (con y sin extracto) al final del proceso, existe una disminución considerable y estadísticamente significativa ($p < 0.05$), respecto a la muestra inicial, de las características dureza, masticabilidad y gomosidad. Esto probablemente debido a la acción enzimática y microbiana presente, que al romper las cadenas proteicas en unas de menor peso molecular provocan la ruptura de la red y, por consiguiente, un descenso en estas

características. Las características de cohesividad, elasticidad, fibrosidad y resiliencia no presentan diferencias significativas entre los geles al inicio y término del tiempo de almacenamiento, esto puede deberse a que en el tejido muscular de esta especie se encuentra una proteína, la paramiosina, común en invertebrados marinos. Esta proteína tiene la cualidad de proveer una estructura elástica a las matrices en las que se encuentra. Se ha demostrado que las enzimas presentes en *Dosidicus gigas* afectan inicialmente a las cadenas de miosina (Dublán-García *et al.*, 2005), por lo que la presencia de esta proteína puede mantenerse constante durante el almacenamiento de los geles.

Al llevar a cabo la determinación de grupos sulfhidrilo en las muestras, se obtuvieron absorbancias sobre 1.0 y transmitancias menores al 0.001%, contrastando contra el manto de calamar gigante el cual presentó un valor de $16.32 \pm 0.89 \mu\text{M}$ de grupos sulfhidrilo por mg de proteína (figura 24). Esto pudo deberse al proceso de extracción, ya que la formación de espuma al emplear carbonato de sodio en disolución para las modificaciones de pH generó un proceso más de desnaturalización, lo que pudo conllevar a la ruptura de estos enlaces y, por ende, las lecturas elevadas que presentaron las muestras. Una dilución posterior a las muestras no se consideró como un método viable ya que la sensibilidad y precisión de la reacción están relacionadas con la utilización de una concentración proteica estandarizada de aproximadamente 5mg.

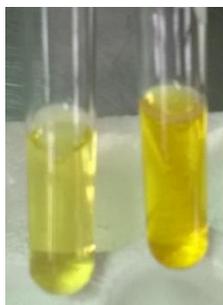


Figura 24 – Determinación de grupos sulfhidrilo libres de manto de calamar gigante (a la izquierda) y gel obtenido del extracto B (a la derecha).

Al concluir el periodo de almacenamiento, se observó que los geles presentaban una apariencia similar al inicio del almacenamiento (figura 25), esto puede sugerir que, de aplicarse otro tipo de metodologías para el control de microorganismos y de actividad enzimática es posible incrementar aún más la vida útil de estos geles.



Figura 25 – Gel adicionado con extracto (a la izquierda) y gel sin extracto en el día 21 de almacenamiento a 4°C.

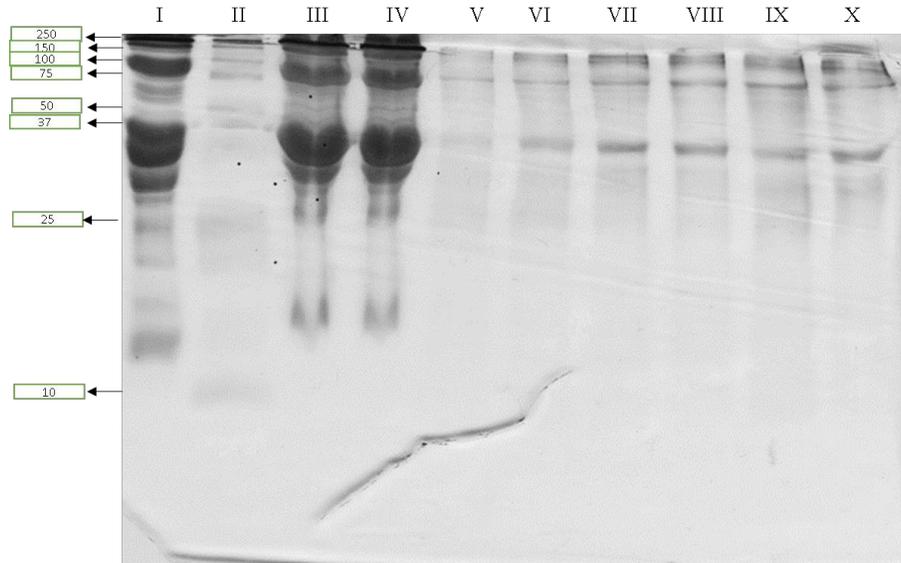


Figura 26 A - SDS-PAGE de muestras obtenidas durante el periodo de almacenamiento de gel SIN extracto. I. Manto de calamar gigante, II. Marcador de pesos moleculares, III y IV. Extracto proteico del proceso B SIN extracto, V. Muestra sin extracto al día 1, VI. Muestra sin extracto al día 3, VII. Muestra sin extracto al día 8, VIII. Muestra sin extracto al día 12, IX. Muestra sin extracto al día 17 y X. Muestra sin extracto al día 21.

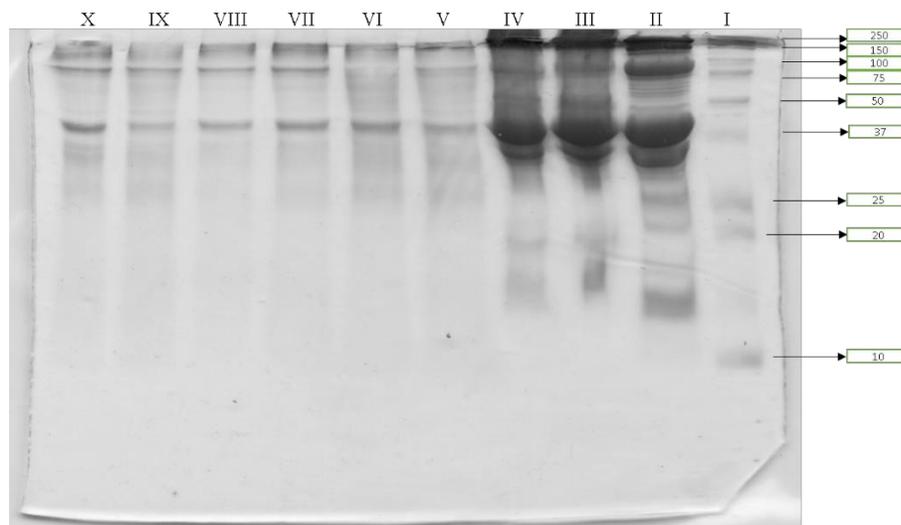


Figura 26 B - SDS-PAGE de muestras obtenidas durante el periodo de almacenamiento de gel CON extracto. I. Marcador de pesos moleculares, II. Manto de calamar gigante, III y IV. Extracto proteico del proceso B CON extracto, V. Muestra con extracto al día 1, VI. Muestra con extracto al día 3, VII. Muestra con extracto al día 8, VIII. Muestra con extracto al día 12, IX. Muestra con extracto al día 17 y X. Muestra con extracto al día 21.

En las figuras 26 A y 26 B es posible observar el incremento de la concentración proteica a través del tiempo, observando el incremento en la intensidad de las bandas presentes. No es observable degradación proteica significativa (pérdida de bandas), por

lo que la actividad enzimática de las proteasas presentes en el gel pudo verse afectada por el proceso de extracción, así como el tratamiento térmico y la presencia de EDTA. Adicionalmente se observa la presencia de una banda extra (aproximadamente en 50 kDa) en el concentrado proteico adicionado con el extracto de orégano, similar a lo reportado por Gómez-Estaca *et al.* (2009) al emplear extractos acuosos de orégano sobre grenetina; esto puede deberse a la presencia de interacciones polifenol-proteína, lo que puede disminuir la presencia de agregados de alto peso molecular y un incremento de agregados de bajo peso molecular, menor a 100kDa. Este tipo de interacciones son resultado en un principio por interacciones hidrófobas y subsecuentemente por la posible formación de puentes de hidrógeno entre los polifenoles (grupos -OH) y las proteínas (grupos -COOH) (Gómez-Estaca *et al.*, 2009).

6 Conclusiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la adición de extracto acuoso de orégano permitió mantener por más tiempo las características fisicoquímicas, disminuyendo la producción de bases volátiles y trimetilamina, así como la calidad microbiológica al disminuir el crecimiento de mesófilos aerobios y coliformes en el gel; por otro lado, se encontró la presencia de una banda proteica adicional en la electroforesis del concentrado proteico adicionado con el extracto de orégano, sin embargo, esto no tuvo impacto sobre el aspecto textural durante el periodo de almacenamiento.

7 Bibliografía.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA.

Asgharzadeh, A., Shabanpour, B., Aubourg, S. P. & Hosseini, H. (2010). Chemical changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) minced muscle during frozen storage: Effect of a previous washing process. *Journal Grasas y aceites*, 61, 95-101.

Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2014). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 543-550.

Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., Carvallo-Ruiz, M. G. & García-Sánchez, G. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Journal of Food Chemistry*, 110, 486-492.

Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suárez, J. C., Lugo-Sánchez, M. E., García-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R. & Peña-Ramos, A. (2015). Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through shift washing treatments. *Journal of Food Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.054>

Dublán-García, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. & Ponce-Alquicira, E. (2005). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods*, 17, 291-310.

Dublán (2006). Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento en refrigeración y congelación. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D.F.

Dyer, W. J. (1945). Amines in fish muscle. I- Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *Atlantic Fisheries Experimental Station*, 6, 351-358.

Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.

Feiner, G. (2006). Meat products handbook: practical science and technology. (1st Ed). Boca Raton: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Chapter 31.

Ferreira, J. C., Kuskoski, E. M., Bordignon, M. T., Barrera, D. & Fett, R. (2007). Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea* Lineau). *Journal Grasas y Aceites*, 58, 264-269.

Galvez-Rogel, A., Ezquerro-Brauer, J. M., Ocano-Higuera, V. M., Ramirez-Wong, B., Torres-Arreola, W., Rouzaud-Sandez, O. & Marquez-Rios, E. (2012). Methods to obtain protein concentrates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) and evaluation of their functionality. *Journal of Food Science and Technology International*, 20, 109-117.

Gao, L., Oomah, B. D. y Mazza, G. (2002). Wheat quality: antioxidant activity wheat millstreams. In P. Ng, & C. W. Wrigley (Eds.), *Wheat quality elucidation*. St. Paul, MN: AACC International, AACC Press. (p.p. 233).

García-Carreño, F. L. & Haard, N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97-113.

Goll, D. E., Otsuka, Y., Nagainis, P. A., Shannon J. D., Sathe S. K. & Muguruma M. (1983). Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *Journal of Food Biochemistry*, 7, 137-179.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernández-Martín, F., Alemán, A. & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. *Journal of Food Hydrocolloids*, 23, 1334-1341.

Gómez-Sánchez, A. I. & López-Malo, A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3, 33-45.

Honikel, K. O., Hamm, R. & Jolley, P. D. (1980). Influence of temperature on the rate of post-mortem metabolism and water-holding capacity of bovine neck muscles. *Journal of Meat Science*, 5, 99-107.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Jafarpour, A. & Gorczyca, E. M. (2008). Alternative techniques for producing a quality surimi and kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Food Science*, 73,415-424.

Kannan, A., Hettiarachchy, N. & Marshall, M. (2012). Food proteins and peptides as bioactive agents. In Hettiarachchy, N. S., Sato, K., Marshall, M. R. & Kannan, A. (Eds.), *Bioactive food proteins and peptides: applications in human health* (pp. 1-28). Boca Raton, FL: CRC Press.

L'Hocine, L. & Pitre, M. (2016). Quantitative and qualitative optimization of allergen extraction from peanut and selected tree nuts. Part 1. Screening of optimal extraction conditions using a D-optimal experimental design. *Journal of Food Chemistry*, 194, 780-786.

Liu, Q., Kong, B., Han, J., Chen, Q. & He, X. (2014). Effect of superchilling and cryoprotectants on the quality of common carp (*Cyprinus carpio*) surimi: Microbial growth,

oxidation and physiochemical properties. *Journal LWT- Food Science and Technology*, 57, 165-171.

Luna-Raya, M. C., Urciaga-García, J. I., Salinas-Zavala, C. A., Cisneros-Mata, M. A. & Beltrán-Morales, L. F. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*, Vol. IV, 22, 535-560.

Mahawanich, T., Lekhavichitr, J. & Duangmal, K. (2010). Gel properties of red tilapia surimi: effect of setting condition, fish freshness and frozen storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1777-1786.

Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A. & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Journal of Food Chemistry*, 135, 1520-1526.

McCarter, Y. S. (2005). Modos de acción de los antimicrobianos. En Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, Coyle, M. B. (Ed.). American Society of Microbiology

Morachis-Valdez, G., Dublán-García, O., López-Martínez, L. X., Galar-Martínez, M., Saucedo-Vence, K. & Gómez-Oliván, L. M. (2015). Chronic exposure to pollutants in Madín Reservoir (Mexico) alters oxidative stress status and flesh quality in the common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Environmental Science and Pollution Research*, 12, 9159-9172.

NMX-F-066-S-1978, Determinación de ceniza en alimentos.

NMX-F-608-NORMEX-2011, Alimentos. Determinación de proteínas en alimentos.
Método de prueba.

NMX-F-317-S-1978, Determinación de pH en alimentos.

NMX-F-615-NORMEX-2004, Alimentos. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos. Método de prueba.

NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias Coliformes. Técnica del número más probable. (Derogada, sustituida por la NOM-210-SSA1-2014)

NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. (Derogada, sustituida por la NOM-210-SSA1-2014)

NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. (Derogada, sustituida por la NOM-210-SSA1-2014)

NOM-116-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa.

NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Nopianti, R., Huda, N. & Ismail, N. (2011). A review on the lost of the functional properties of proteins during frozen storage and the improvement of gel-forming properties of surimi. *Journal of Food Technology*, 6, 19-30

Ortez, J. H. (2005). Prueba de difusión por disco. En Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, Coyle, M. B. (Ed.). American Society of Microbiology

Palafox, H., Córdova-Murueta, J. H., Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2009). Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing, *Journal Process Biochemistry*. 44, 581-587.

Paraskevoula, Agrafioti, T. & Katsanidis, E. (2012). Effects of additives on the selected quality attributes and cooking yield of squid: modeling and optimization. *International Journal of Food Properties*, 15, 579-589.

Pellegrini, G., Miller, N., & Rice-Evans, C. A. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azino-bis(3-

ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). In L Parcker (Ed.), *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, Vol. 299.

Ramirez-Suarez, J. C., Ibarra-León, L. R., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., García-Sánchez, G. & Carvallo-Ruiz, G. (2008). Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. *Journal of Food Chemistry*, 111, 586-591.

Ranilla, L. G., Kwon, Y. I., Apostolidis, E. & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101 (12), 4676–4689.

Rawdkuen, S. & Benjakul, S. (2007). Whey protein concentrate: Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish. *Journal of Food Chemistry*, 106, 1077-1084.

Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M. & Benjakul S. (2009). Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Journal of Food Chemistry*, 112, 112-119.

Rodríguez-Sauceda, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista Ra Ximhai*, 7 (1), 153-170.

Rojas, J. J., García, A. M. & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la capacidad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 4, 28-32.

SAGARPA. (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca.

Sánchez-Alonso, I., Careche, M. & Borderías, A. J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Journal of Food Chemistry*, 100, 48-54.

Sathe, S.K. (2012). Protein solubility and functionality. In Hettiarachchy, N. S., Sato, K., Marshall, M. R. & Kannan, A. (Eds.), *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions and commercialization* (pp. 95-123). Boca Raton: Taylor & Francis Group

Scramlin S. M., Newman, M. C., Cox, R. B., Sepe, H. A., Alderton, A. L., O'Leary, J. & Mikel, W. B. (2010). Effects of oregano oil brine enhancement on quality attributes of beef *Longissimus dorsi* and *Semimembranosus* muscles from various age animals. *Journal of Food Science*, 75, 89-94.

Sevilla Ascencio (2013). Cuantificación de compuestos fenólicos totales y evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos y acuoso-orgánicos de seis especias utilizadas en el Estado de México por los métodos DPPH• y ABTS•+. Tesis de licenciatura para obtener el título de Químico en Alimentos. Toluca, Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Shi, L., Wang, X., Chang, T., Wang, C., Yang, H. & Cui, M. (2014). Effects of vegetable oils on gel properties of surimi gels. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 586-593.

Suárez-Mahecha, H., Restrepo-Molina, D. A. & Carrasquilla-Galeano, L. A. (2011). “Influencia de Especies Naturales en la Vida Útil y Aceptación Sensorial de Salchicha Bratwurst”. *Revista Facultad de Agronomía-Medellín*, 64 (1), 6007-6013.

United States Patent, 5436024. (1995). Cryoprotected surimi product.

Youssef, M. K. & Barbut, S. (2010). Physicochemical effects of the lipid phase and protein level on meat emulsion stability, texture and microstructure. *Journal of Food Science*, 75, 108-114.

Zhu, Y., Ma, L., Yang, H., Xiao, Y. & Xiong, Y. L. (2016). Super-chilling (-0.7°C) with high-CO₂ packaging inhibits biochemical changes of microbial origin in catfish (*Clarias gariepinus*) muscle during storage. *Journal of Food Chemistry*, 206, 182-190.

8 Anexo I

El mié., abr. 19, 2017 a las 12:43 PM, Food Chemistry
<esserver@eesmail.elsevier.com> escribió:

Dear Dr. Dublán-García,

Your submission entitled Functional and textural properties, and shelf life of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) gels obtained by different extraction processes has been received by Food Chemistry.

All manuscripts submitted to Food Chemistry are evaluated before a decision is made concerning whether or not to assign to a handling editor for consideration for peer review, based on scope, technical criteria and language. The status "Submitted to Journal" indicates that your paper is undergoing the initial technical check. When the manuscript has passed this technical check you will be notified that it has been given a number and assigned to an Editor, and the status in EES will change to "With Editor". Please also be advised that all papers are now being processed using Cross-Check plagiarism detection software (iThenticate).

Food Chemistry receives an average of 150 new manuscripts a week; There is currently a delay of 20-25 days before allocation to an editor for manuscripts that pass the technical checks.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/FOODCHEM>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: octavio_dublan@yahoo.com.mx

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/FOODCHEM/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu

3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Food Chemistry.

Kind regards,
Elsevier Editorial System
Food Chemistry

Functional and textural properties, and shelf life of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) gels obtained by different extraction processes

Francisco A. López Medina^a, Leticia X. López Martínez^b, Leobardo M. Gómez Oliván^a, Hariz Islas Flores^a, Octavio Dublán García^{a}*

^a Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Avenida Paseo Colón esq. Paseo Tollocan S/N, C.P. 50180, Toluca, Estado de México, México.
octavio_dublan@yahoo.com.mx

^b Catedrático CONACYT - Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Culiacán, Culiacán, Sinaloa, México.

*Corresponding author: Fax: + 52 722 2173890, E-mail: octavio_dublan@yahoo.com.mx
Corresponding Author's Address: Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. Paseo Colón esq. Paseo Tollocan S/N Col. Residencial Colón, CP 50120.

Running title: Jumbo squid protein extracts: gel functional properties and shelf life

Abstract

Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) is a commercially valuable mollusk in Mexico; 80% of its body is edible. Despite the high protein content (~18%) and low cholesterol content of this species, its high proteolytic activity (microbial and endogenous enzymes) induces protein degradation and consequent reduction in functional properties from a structural viewpoint. Gelation capacity (texture profile of the gels obtained), solubility, water holding capacity, foaming capacity, emulsification capacity and emulsion stability were evaluated in protein concentrates obtained by four different processes: (A) myofibrillar protein extraction with distilled water and no pH-shifting, this being the control group; (B) alkaline solubilization and isoelectric precipitation; (C) acidic solubilization and isoelectric precipitation; and (D) process A and isoelectric precipitation. Process B showed superior gelation capacity, D had high emulsion stability across a wide range of pH values (4.0-8.0) and C lower plate counts of aerobic mesophiles. Therefore, all three alternative extraction processes showed techno-functional advantages.

Keywords: *Dosidicus gigas*; protein extraction; gelation capacity; shelf life

1. Introduction

Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) is the largest, most abundant squid species in the pelagic zone of the Eastern Pacific Ocean, from Chile to the Oregon coast. It is normally exported to various, mostly European and Asian, countries. Blanco-Pascual, Fernández-Martín and Montero (2014) cite diverse studies reporting jumbo squid as an excellent raw material for manufacturing food products of high commercial value, such as gels, emulsions, surimi and others, based on collagen from its mantle.

In Mexico, this species is economically important. In 2013, squid ranked seventh in capture production, the total catch being 36,381 metric tons, and was 20th in terms of value (13,101,048 USD) according to the federal ministry responsible for fisheries (SAGARPA, 2013).

Among the characteristics that are typical of this meat species is a high enzymatic activity, more specifically, proteolysis. Palafox, Córdova-Murueta, Navarrete del Toro and García-Carreño (2009) cite it as a drawback in the techno-functional application of this mollusk, in addition to the flavor generated by free amino acids in the muscle and the strong ammonia odor due to high concentrations of non-protein nitrogenous compounds (NPNCs). Sánchez-Alonso, Careche and Borderías (2007) concur, stating that several studies indicate that the proteolytic enzymes involved in the autolysis of this squid are part of the metalloproteinase group and, when the medium contains 2 mM EDTA, autolysis is significantly suppressed.

Diverse methods have been developed to obtain protein concentrates with higher yields from jumbo squid. The different processes used for this purpose include pH-driven protein solubilization, as noted by Palafox et al. (2009), in which pH changes are made during the process of extraction of myofibrillar proteins. Modifications in the functional properties of proteins may be related to conformational changes as a result of the extraction process.

One advantage of the above-mentioned extraction processes is a reduction in sarcoplasmic proteins. This includes the enzymes present and might lead to obtaining not only protein concentrates with techno-functional characteristics that have been modified by the process itself, but also reduced enzymatic activity and concentrates that are stable during storage.

The present study aimed to evaluate the impact of different methods of protein extraction on the techno-functional characteristics of the concentrates obtained, with a view to their application in developing food products based on this meat species.

2. Methodology

2.1 Raw material

Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle was obtained from a local commercial establishment within 15 days of capture. The mantle was cut into portions weighing approximately 150 g, placed in polyethylene bags, and frozen until further use.

2.2 Reagents

Bovine serum albumin (BSA), acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide and Coomassie® brilliant blue R-250 were obtained from Sigma-Aldrich. Reagents purchased from J.T. Baker include NaCl, EDTA, TEMED (tetramethylethylenediamine), Tris Base, urea, β -mercaptoethanol, glycine, glacial acetic acid, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate and pentahydrate copper sulfate. Sodium carbonate, citric acid, sodium and potassium tartrate, methanol, ammonium persulfate, sodium hydroxide and hydrochloric acid were obtained from Fermont. Dodecyl sodium sulfate and bromophenol blue were purchased from Hycl de México.

2.3 Protein extraction

The procedure reported in Palafox et al. (2009) was used, with modifications: collagen was removed manually from the squid mantle, 100 g were homogenized with water and ice in a 1:1:1 ratio. *Process A*: the mixture was mechanically shaken in an ice bath (2-4°C) for 20 min, filtered through a 2mmx2mm hole-size mesh, shaken again in an ice bath for 10 min, then centrifuged at 6500g for 20 min. The precipitate obtained was named “concentrate A”.

Process B: mixture pH was adjusted to 10.0 using 3.2 M sodium carbonate. The mixture was shaken in an ice bath (2-4°C) for 15 min, then centrifuged at 6500 g for 20 min. The supernatant, containing protein that is soluble in an alkaline medium, was removed and its pH adjusted to 4.5 with 2.3 M citric acid; the latter pH is reported by Sánchez-Alonso et al. (2007) to be the isoelectric point (pI) of jumbo squid myofibrillar proteins. The sample was centrifuged at 6500g for 20 min; the precipitate was resuspended, its pH was adjusted to 6.5 with 3.2 M sodium carbonate, then the sample was centrifuged under the same conditions. This precipitate was named “concentrate B”. *Process C:* pH was adjusted to 3.0 using 2.3 M citric acid. The mixture was shaken in an ice bath (2-4°C) for 15 min, then centrifuged at 6500g for 20 min. The supernatant, containing protein that is soluble in an acidic medium, was removed and its pH adjusted to 4.5 with 3.2 M sodium carbonate. The sample was centrifuged at 6500g for 20 min; the precipitate was resuspended, its pH was adjusted to 6.5 with 3.2 M sodium carbonate, then the sample was centrifuged under the same conditions. This precipitate was named “concentrate C”. *Process D:* concentrate A was suspended in water, its pH was adjusted to 4.5 with 2.3 M citric acid, and the sample was centrifuged at 6500g for 20 min. The precipitate was resuspended, its pH was adjusted to 6.5 with 3.2 M sodium carbonate, and the sample was subsequently centrifuged under the same conditions. This precipitate was named “concentrate D”.

2.4 Determination of protein concentration

Protein concentration in end products of the extraction processes was determined by the Biuret method as described by Palafox et al. (2009). Samples (1 g) of protein concentrate were diluted 1:15 and 1:20 with a 10% NaOH and 0.6 M NaCl solution. Dilutions were reacted for 30 min in total darkness and absorbance was read at 540 nm in a GENESYS™ 10S Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). Protein concentration was obtained by extrapolating absorbance values on a standard BSA curve.

2.5 Solubility

The method proposed by Rawdkuen, Sai-Ut, Khamsorn, Chaijan and Benjakul (2009) was used, with modifications: 1 g of protein concentrate was homogenized with 4 mL distilled

water and the sample was centrifuged at 6500g for 20 min. The Biuret method was used to determine protein that is soluble in the liquid phase. Results are expressed as percentages of solubility: soluble protein content with respect to total protein content in 1 g of concentrate.

2.6 Water holding capacity (WHC)

WHC was determined as in Honikel, Hamm and Jolley (1980), with modifications: 5 g of protein concentrate were homogenized for 1 min with 8 mL of a 0.6 M NaCl solution, then centrifuged at 6500g for 15 min. WHC was expressed as mL of the 0.6 M NaCl solution retained per g of protein concentrate.

2.7 Foaming and emulsification capacities

The procedure proposed by Ferreyra, Kuskoski, Bordignon Luiz, Barrera Arellano and Fett (2007) was used, with modifications: dilutions at a concentration of 10 mg protein/mL were prepared with 0.15 M Tris-HCl buffer at pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0; 10 mL of each dilution were placed in graduated conical-bottom polyethylene tubes and shaken for 15 s at maximum speed on a GENIE®2 vortex (Scientific Industries, New York, NY, USA). The stable foam volume was determined after 20 min; 30 mL of each dilution were emulsified with 15 mL canola oil in an Osterizer blender for 15 s. The emulsion was poured into graduated conical-bottom polyethylene tubes and the total volume produced, the volume of the emulsion generated, and emulsion stability were determined after 30 min.

2.8 Gelation capacity

The technique in Rawdkuen et al. (2009) and Mahawanich, Lekhavichitr and Duangmal (2010) was used, with modifications: samples were adjusted to a concentration of 50 mg protein/mL with phosphate buffer (100 mM, pH 6.0), 0.6 M NaCl and 20 mM EDTA. Gelation was carried out in cylindrical glass containers by a process of temperature ramps: samples were maintained at 40°C for 30 min, then the temperature was ramped up 1°C/min until the thermal core reached 75°C. Thermal shock was carried out in an ice/water bath. Gels were stored refrigerated (4°C) for 24 h prior to evaluation.

2.8.2 Cooking yields

The technique in Youssef and Barbut (2010) was used to determine post-thermal shock loss of liquids by weight. Cooking yields were expressed as the weight percentage of solid gel after draining of the liquid expelled.

2.8.3 Texture profile

The test was carried out as proposed by Jafarpour and Gorczyca (2008), with modifications: texture profile analysis (TPA) of the standard-size (20 mm height, 30 mm diameter) gels was done using a TA-xT2 texture analyzer v2.63 (Texture Technologies, Scarsdale, NY, USA). A 10-mm-diameter cylindrical piston adapted to a 25-kg load cell was used, with compression height 10 mm and deformation speed 1 mm/s. The parameters evaluated were as follows: hardness (*g*), cohesiveness, springiness, chewiness, stringiness, resilience and gumminess.

2.9 Molecular weight profile (SDS-PAGE)

The procedure in García-Carreño and Haard (1993) was used, with modifications: samples of the supernatants and precipitates obtained during the extraction processes were subjected to denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Samples were prepared as follows: to 200 μ L of supernatant was added 100 μ L Tris-HCl buffer (10.4 g Tris-HCl, 6.9 g glycine, 480 g urea, 1.2 g EDTA per L) pH 8.0. Solid samples (0.1 g of precipitate or gel) were dissolved in 300 μ L of this buffer. To samples thus prepared was added 700 μ L of a loading buffer containing β -mercaptoethanol as the reducing agent. Samples were placed in a water bath at 90°C for 10 min, then injected in two-gel systems consisting of a stacking gel at 5%T and a resolving gel at 10%T. Separation was done at a constant voltage of 200 mV for 40 min using a Mini-PROTEAN® Tetra Cell system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Samples were fixed in a 20% methanol and 0.5% formaldehyde solution for 30 min. A solution of 40% methanol, 15% acetic acid and 0.1% Coomassie® brilliant blue R-250 was used for staining.

2.10 Microbiological analysis

Samples stored at 4°C were used for this procedure. Plate count agar was used to determine aerobic mesophiles, incubated at 35°C±1°C for 48 h. The analysis was conducted for 21 days subsequent to preparation of the samples (AOAC, 1990).

2.11 Statistical analysis

Data were analyzed by Tukey's HSD test ($p < 0.05$), using Statgraphics Centurion® 16.103. All determinations were performed in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1 Protein extraction

Among the characteristics of proteins, a most interesting one is the isoelectric point (pI). It is defined as the pH at which the net electrical charge of the protein is zero, and it can be determined using the solubility curve of a protein. Normally, at values below or above the pI, protein solubility increases. This is due to modification of the net charge at which water-protein interactions increase and repulsion forces are present between like-charged proteins, preventing aggregate formation and precipitation (Sathe, 2012). This type of phenomenon is useful during protein extraction since, by using an extremely acidic or alkaline pH, most proteins in a sample can be rendered soluble, enabling the elimination of other components such as connective tissue. On the other hand, the pI permits a certain degree of selectivity in protein extraction since it depends entirely on the side chains of the amino acids that make up the proteins. In other words, in selecting the pH to carry out precipitation in a complex sample, the protein group to be extracted can be reduced in terms of this parameter.

In the precipitation stage of processes B and C, foam formation was used as an additional method of denaturation. Although Sánchez-Alonso et al. (2007) consider it a technological drawback due to bubble formation, in our study this stage of the process had a positive impact on peptide presence in the supernatant after centrifugation. This is evident from the SDS-PAGE profile (Fig. 1): in the precipitation stage of process D, myosin, paramyosin and actin are visible in the supernatant (after centrifugation) while in processes B and C no low molecular weight peptide bands are seen. This suggests that foam formation denatures

these protein fractions which are then incorporated into the resulting precipitate, there being thus a lesser loss of proteins of interest, as is the case of myosin, paramyosin and actin.

3.2 Protein concentration

There are a large number of techniques for determining protein concentration in a sample; one of them needs to be selected based on diverse aspects including: low cost, repeatability, reproducibility, sensitivity, speed, facility, and lack of interference from substances present in the sample (Sathe, 2012). Marine species normally contain NPNCs, which are composed mainly of trimethylamine, ammonia and free amino acids; these compounds may be present at high concentrations (Sánchez-Alonso et al., 2007). Thus, total nitrogen determination may not be the most exact means of measuring protein concentration in this type of food product, in this sense, the biuret technique is the most adequate one.

There are significant differences in protein concentration among the extracts obtained, extraction process D having the lowest concentration and processes A, B and C higher ones (Table 1). In A, there may still be a substantial concentration of sarcoplasmic proteins. In B and C, solubilization/precipitation implies a change in protein conformation with the possible exposure of nonpolar groups leading to formation of poorly soluble aggregates. D, however, may have followed a different process of conformational change since, while aggregates formed during precipitation, they dissolved when neutralized. This may mean exposure of polar groups and consequently greater water-protein interaction, as well as an increase in the amount of water in the protein extract with respect to the protein present, and therefore a lower relative concentration.

Table 1. Functional properties of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) protein concentrates obtained by four different extraction processes.

Process	Protein concentration (mg protein/g)	Solubility (% soluble protein)	Water holding capacity (mL of 0.6 M NaCl retained/g)	Cooking yields (weight percentage)
A	79.01 ± 2.9 ^a	12.33 ± 0.28 ^b	0.333 ± 0.0251 ^a	75.4 ± 0.89 ^a
B	89.69 ± 31.4 ^a	7.04 ± 0.83 ^a	0.422 ± 0.0025 ^b	98.51 ± 0.34 ^d
C	69.92 ± 15.7 ^a	6.99 ± 0.66 ^a	0.424 ± 0.0071 ^b	81.92 ± 0.56 ^b
D	55.61 ± 4.3 ^a	8.2 ± 1.67 ^a	0.723 ± 0.0305 ^c	95.7 ± 0.35 ^c

Different lowercase superscript letters in the same column indicate significant differences between extraction processes ($p < 0.05$).

3.3 Solubility

In the technological application of meat species, one factor that has been considered in food product processing is the solubility of the proteins present, i.e. the percentage of proteins that, under particular pH, temperature and ionic force conditions, are water-soluble after the sample is subjected to a moderate centrifugal force. This parameter has been used as an indicator of the potential applications of a raw material in terms of capacity to form foams, emulsions or gels. However, this type of correlation depends on the species, age and sex of the specimen, among other factors (Sathe, 2012).

Table 1 lists the solubility values determined for the extraction processes used in our study. The lower values obtained in processes B, C and D, compared to A, are probably due to the process of extraction, since water volumes used in the extraction are discarded. Similarly, solubilization in processes B and C may favor exposure of hydrophobic groups, generating less water-protein interactions and a consequent decrease in solubility values. Cortés-Ruiz, Pacheco-Aguilar, Lugo-Sánchez, Carvallo-Ruiz and García-Sánchez (2008) mention that proteins must be soluble enough to interact with other components such as water and fat as well as among themselves, a property that may be correlated with a potential technological application such as emulsification or gelation capacity. Our results are consistent with those of Galvez-Rogel et al. (2012), who found lower solubility values in squid mantle protein

extracts obtained by pH-shift processing, compared to a concentrate obtained without using this procedure.

3.4 Water holding capacity (WHC)

Among the functional properties of proteins, WHC is one that provides useful information on other properties. Proteins are able to interact with water molecules in the medium thanks to the polar side chains of the amino acids that make up the proteins, while protein type, structure, pH, temperature and ionic forces must also be considered. This means that a protein is able to interact with a larger or smaller number of water molecules depending on its current state. Knowing this is useful in order to understand and predict protein behavior, as well as to correlate it with other characteristics that depend on water-protein interaction.

No significant differences were found between processes B and C, but they did occur in the other two processes (Table 1). In this regard, the alkaline or acidic solubilization procedure in processes B and C may affect WHC, since aggregates 2 mm in diameter formed during precipitation. On the other hand, during the precipitation stage in process D, smaller-sized aggregates (< 0.5 mm in diameter) were observed, so that the size of the aggregates formed is assumed to affect WHC.

3.5 Foaming and emulsification capacities

Emulsion formation is among the more widely exploited properties of proteins. It is related to the characteristics of the side chains of the amino acids that make up the proteins. These groups can be hydrophilic or hydrophobic, and the protein as a whole can act both ways, interacting with water and nonpolar agents such as oils and fats. Proteins at the oil/water interface direct polar groups towards water and nonpolar groups in the opposite direction. This leads to the formation of micelles, in which the fatty component within is surrounded by aligned protein molecules that interact with the aqueous medium. Since proteins have a net electrical charge, the emulsion formed can be stabilized because electrostatic repulsive forces prevent contact among the micelles and subsequent loss of structure. A parameter to consider in studying emulsification capacity and its subsequent technological application, is

the amount of oil that can be emulsified with a specific volume of an aqueous solution of known protein concentration. Knowing the stability of these emulsions over time, i.e. the volume lost after a resting period under controlled conditions, is also important (Kannan, Hettiarachchy, Sato & Marshall, 2012b). The stability of emulsions obtained from protein concentrates was determined 30 min after the emulsion was produced. Significant differences were observed among the protein concentrates, with concentrate C showing the least stability in emulsions produced at different pH values. The opposite was true of concentrate D, in which the emulsions obtained at pH values 5.0 to 8.0 had > 90% stability, making it a viable option for producing food emulsions (Fig. 2).

Foam is often defined as the dispersal of air bubbles in a continuous liquid phase containing a soluble surfactant. The foaming properties of proteins are important in food products such as sponge cake and ice cream among others. In foams, the air bubbles are encapsulated by a thin layer of the continuous phase. Like emulsions, foams are thermodynamically unstable due to the large interfacial water-air surface. Agents are needed to maintain the interface against bubble coalescence, reducing interfacial tension, stabilizing the layer of solvent against internal and external forces, and forming a more elastic film of air bubbles. The foaming properties of proteins are determined based on the increase in volume that takes place when air is introduced into the protein solution or dispersion (Kannan et al., 2012b). As can be seen in Figure 3, at pH values of 6.0 to 7.0, processes A and D had the highest foaming capacity values. This may be due to exposure of hydrophobic groups in processes B and C, during which, forces of attraction are present among the proteins, and coalescence is consequently favored.

3.6 Gelation capacity

3.6.1 Cooking yields

The protein gelation process is dynamic, with the formation and rupture of diverse types of interactions such as hydrogen bonds, van der Waals forces and dipole-dipole forces, among others. This process takes place in various stages depending on the thermal process used. In the adjustment stage, a temperature of 40-45°C is maintained for a varying period of time, allowing proteins to initiate the unfolding process and formation of the first protein-protein

interactions. The second stage consists in a gradual temperature increase until the gelation temperature of 70-75°C is reached in the thermal core. This permits formation of a water-containing protein network and of water-protein, protein-protein and fat-protein interactions (Feiner, 2006). Subsequently, there is a thermal shock stage in which water and ice are used to reduce the temperature, eliciting contraction of the protein network that was formed and expulsion of a liquid phase containing water, proteins, salts and fat. Cooking yields can be determined after 24 h of storage of the gels at 4°C by subtracting the weight of the liquid expelled, and are expressed as weight percentages. Significant differences were observed among the four processes in the present study (Table 1). Process B had the highest cooking yield values, followed by D and C. This may be due to the type of conformational change that takes place during solubilization and precipitation.

3.6.2 Texture profile analysis

TPA permits the evaluation of diverse important properties in meat based gels. The test is based on simulation of a double bite on a food product, using a specific initial force and compression speed. The resulting diagram represents the force exerted by the mechanism, and areas representing response variables are visible. Of the analyzed properties (Table 2), gels obtained from concentrate B had the highest values of hardness and stringiness (before storage). Gels obtained from concentrate C did not differ significantly (before storage) from B gels in terms of gumminess. This may be due to the conformational changes that proteins undergo when solubilized and later desolubilized, a situation not occurring in processes A and D. Elasticity and resilience were highest in gels from process A (before storage). This may be due to the fact that these properties are related to a protein present in jumbo squid and mollusks in general – tropomyosin – which has been reported as the protein responsible for the flexible, elastic characteristics of gels made from species containing it.

After storage, no significant differences were found among the treatments in the parameters of hardness, springiness, chewiness and gumminess. This indicates that regardless of the extraction process used and initial properties, the loss of structural properties may involve a similar mechanism, i.e. endogenous enzyme activity. This is supported by the microbiology

results, in which process C had a lower microbial load than all other processes at the end of storage.

Table 2. Texture profile analysis (TPA) of gels obtained from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) protein concentrates.

Process	Hardness (g)	Cohesiveness	Springiness	Chewiness	Stringuiness	Resilience	Gumminess
A	0.154±0.032 ^a	0.351±0.016 ^a	2.489±0.47 ^d	0.131±0.009 ^a	19.31±0.241 ^c	3.161±0.691 ^c	0.053±0.009 ^a
Af	0.175±0.054 ^a	0.552±0.135 ^b	0.958±0.051 ^{bc}	0.089±0.026 ^a	6.233±0.722 ^a	0.366±0.075 ^a	0.095±0.033 ^a
B	24.791±1.378 ^c	0.811±0.025 ^{cd}	0.372±0.007 ^a	7.507±0.799 ^b	33.936±0.602 ^c	0.508±0.005 ^a	20.147±1.739 ^b
Bf	0.391±0.092 ^a	0.719±0.041 ^c	0.912±0.018 ^{bc}	0.254±0.051 ^a	5.115±0.464 ^a	0.294±0.021 ^a	0.278±0.053 ^a
C	22.548±1.327 ^b	0.909±0.028 ^d	0.418±0.012 ^a	8.555±0.002 ^c	25.547±1.485 ^d	0.712±0.078 ^a	20.462±0.579 ^b
Cf	0.062±0.01 ^a	0.246±0.029 ^a	0.701±0.021 ^{ab}	0.011±0.001 ^a	12.77±0.195 ^b	0.064±0.006 ^a	0.015±0.001 ^a
D	0.262±0.022 ^a	0.385±0.039 ^a	0.759±0.048 ^{ab}	0.076±0.008 ^a	20.611±1.542 ^c	0.098±0.001 ^a	0.101±0.006 ^a
Df	0.120±0.006 ^a	0.367±0.011 ^a	1.302±0.055 ^c	0.057±0.003 ^a	10.606±1.206 ^b	1.486±0.234 ^b	0.044±0.002 ^a

A, B, C, D = TPA before storage. Af, Bf, Cf, Df = TPA after storage. Different lowercase superscript letters in the same column indicate significant differences between extraction processes ($p < 0.05$).

3.7 Molecular weight profile (SDS-PAGE)

In Figure 1-A, a band is visible in processes B and C (both in gels and in protein extracts) below the 37 kDa band; probably, the process of extraction with foam formation permits this protein fraction to be extracted. During these two processes, when the protein concentrates are neutralized, the soluble fraction in the supernatant shows different characteristics (Fig. 1-B). The supernatant from process B has bands for myosin and paramyosin, in contrast to the supernatant from process C which displays for the most part actin.

3.8 Microbiological analysis

The test is based on the existence of one or more colony-forming units (CFUs) which can be a single cell or a group of cells capable of growing under study conditions. In the case of aerobic mesophiles, growing conditions permit undemanding microorganisms able to adapt and grow in a culture medium with a carbon and nitrogen source, at 37°C temperature. Figure 4 shows that while process D was similar in behavior to processes A and B, there is a difference of one order of magnitude on day 7 of storage between the former process and

the latter two. On the other hand, process C is evidently different from all other processes from day 10 of storage on. This may be due to the fact that, in an acidic medium, peptides are released by the protein chain. Such peptides have been shown to have an antimicrobial activity (Mulero-Cánovas, Zafrilla-Rentero, Martínez-Cacha, Leal-Hernández & Abellán-Alemán, 2011) and, while usually released by enzymatic activity, they can also be released by chemical methods (Kannan, Hettiarachchy & Marshall, 2012a).

Conclusions

There are significant differences ($p < 0.05$) between the protein concentrates obtained by the different extraction processes.

Concentrates B and C, which have similar high values of gelation capacity, can be used to manufacture meat based gels made from this mollusk.

Extraction processes B, C and D decreased soluble protein content; the latter may include proteolytic enzymes present in this meat species; therefore, autodegradation of proteins of interest can be reduced and the functional properties of these concentrates maintained.

An increase in WHC was found in concentrates B, C and D relative to concentrate A; WHC is an important factor to consider in selecting proteins for food product development, and is also an indicator of product stability.

Extraction processes A and D had a higher foaming capacity at pH values 6.0-7.0 and may therefore be viable options for developing edible foams, as adjuvants of proteins from other sources.

Conflict of interest

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Acknowledgements,

Francisco Antonio López Medina thanks the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) for a graduate scholarship.

References

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (1990). *Official methods of analysis*. (15th ed.). Arlington, VA: AOAC.

Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, P. (2014). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. *Journal of Food Science and Technology*, *55*, 543-550.

Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M. E., Carvallo-Ruiz, M. G., & García Sánchez, G. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Journal of Food Chemistry*, *110*, 486-492.

Feiner, G. (2006). *Meat products handbook: practical science and technology*. (1st ed). Boca Raton: Woodhead Publishing and CRC Press, (Chapter 31).

Ferreira, J. C., Kuskoski E. M., Bordignon Luiz, M. T., Barrera Arellano, D., & Fett, R. (2007). Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea* Lineau). *Grasas y Aceites*, *58*, 264-269.

Galvez-Rogel, A., Ezquerro-Brauer, J. M., Ocano-Higuera, V. M., Ramirez-Wong, B., Torres-Arreola, W., Rouzaud-Sandez, O., & Marquez-Rios, E. (2012). Methods to obtain protein concentrates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) and evaluation of their functionality. *International Journal of Food Science and Technology*, *20*, 109-117.

García-Carreño, F. L., & Haard, N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, *17*, 97-113.

Honikel, K. O., Hamm, R., & Jolley, P. D. (1980). Influence of temperature on the rate of post-mortem metabolism and water-holding capacity of bovine neck muscles. *Journal of Meat Science*, *5*, 99-107.

Jafarpour, A., & Gorczyca, E. M. (2008). Alternative techniques for producing a quality surimi and kamaboko from common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Food Science*, *73*, 415-424.

Kannan, A., Hettiarachchy, N., & Marshall, M. (2012a). Food proteins and peptides as bioactive agents. In N. S. Hettiarachchy, K. Sato, M. R. Marshall, & A. Kannan (Eds.), *Bioactive food proteins and peptides: applications in human health* (pp. 1-28). Boca Raton, FL: CRC Press.

Kannan, A., Hettiarachchy, N., Sato, K., & Marshall, M. (2012b). Food proteins and peptides: structure-function relationship. In N. S. Hettiarachchy, K. Sato, M. R. Marshall, & A. Kannan (Eds.), *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions and commercialization* (pp. 49-93). Boca Raton, FL: CRC Press.

Mahawanich, T., Lekhavichitr, J., & Duangmal, K. (2010). Gel properties of red tilapia surimi: effect of setting condition, fish freshness and frozen storage. *International Journal of Food Science and Technology*, *45*, 1777-1786.

Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cacha, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, *23*, 219-227.

Palafox, H., Córdova-Murueta, J. H., Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2009). Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. *Process Biochemistry*, *44*, 581-587.

Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M., & Benjakul, S. (2009). Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Journal of Food Chemistry*, *112*, 112-119.

Sánchez-Alonso, I., Careche, M., & Borderías, A. J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Journal of Food Chemistry*, *100*, 48-54.

Sathe, S. K. (2012). Protein solubility and functionality. In N. S. Hettiarachchy, K. Sato, M. R. Marshall, & A. Kannan (Eds.), *Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions and commercialization* (pp. 95-123). Boca Raton, FL: CRC Press.

SAGARPA. (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Mexico DF: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Youssef, M. K., & Barbut, S. (2010). Physicochemical effects of the lipid phase and protein level on meat emulsion stability, texture and microstructure. *Journal of Food Science*, *75*, 108-114.

Figure Captions

Figure 1. SDS-PAGE of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) protein extracts, gels, supernatants and precipitates obtained by four different extraction processes: A, B, C and D.

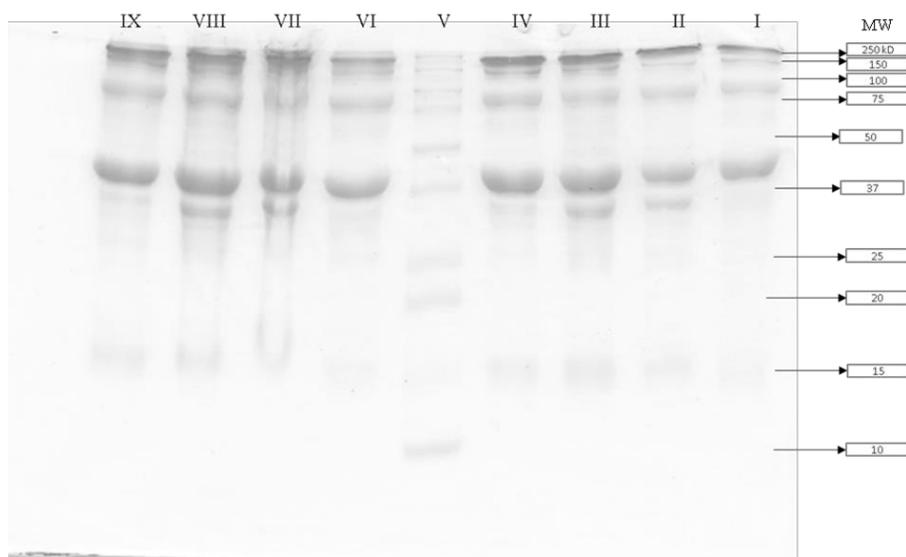


Figure 1-A. SDS-PAGE of protein extracts and gels. **I-IV:** protein extracts from extraction processes A (I), B (II), C (III) and D (IV). **V:** molecular weight (MW) marker. **VI-IX:** gels obtained from protein extracts A (VI), B (VII), C (VIII) and D (IX).

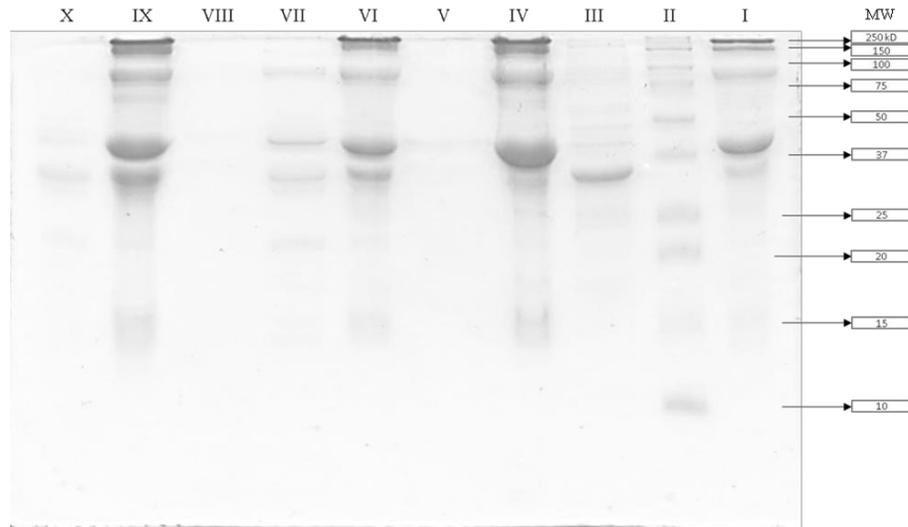


Figure 1-B. SDS-PAGE of supernatants and precipitates. **I:** jumbo squid mantle protein. **II:** MW marker. **III-IV:** supernatant (III) and precipitate (IV) from isoelectric precipitation in process D. **V-VI:** supernatant (V) and precipitate (VI) from isoelectric precipitation in process B. **VII-VIII:** supernatants from neutralization in process B (VII) and isoelectric precipitation in process C (VIII). **IX-X:** precipitate from isoelectric precipitation (IX) and supernatant from neutralization (X) in process C.

Figure 2. Emulsification properties of protein extracts from jumbo squid (*Dosidicus gigas*), obtained by four different extraction processes: A, B, C and D.

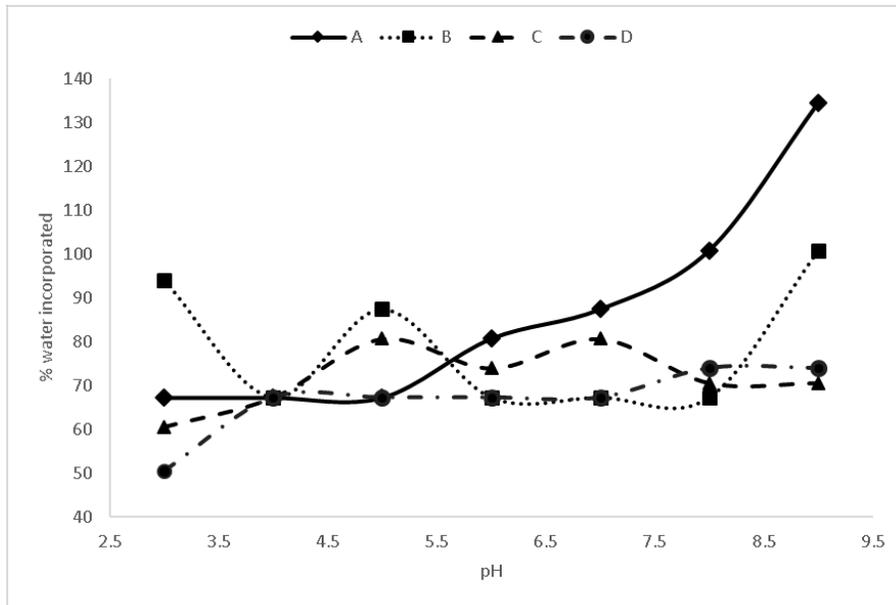


Figure 2-A. Percentage of water incorporated into the emulsion, using the oil phase as 100%.

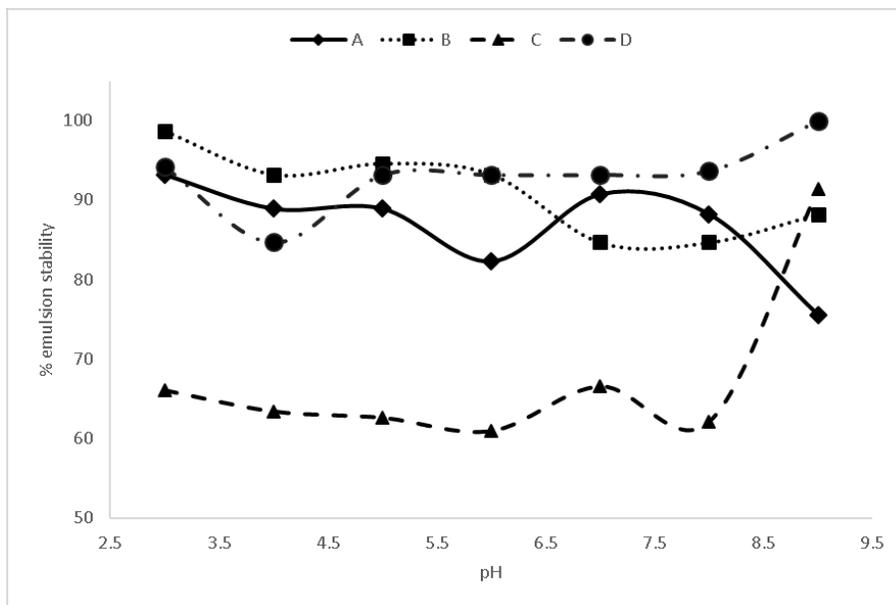


Figure 2-B. Emulsion stability after 30 min at room temperature (20°C).

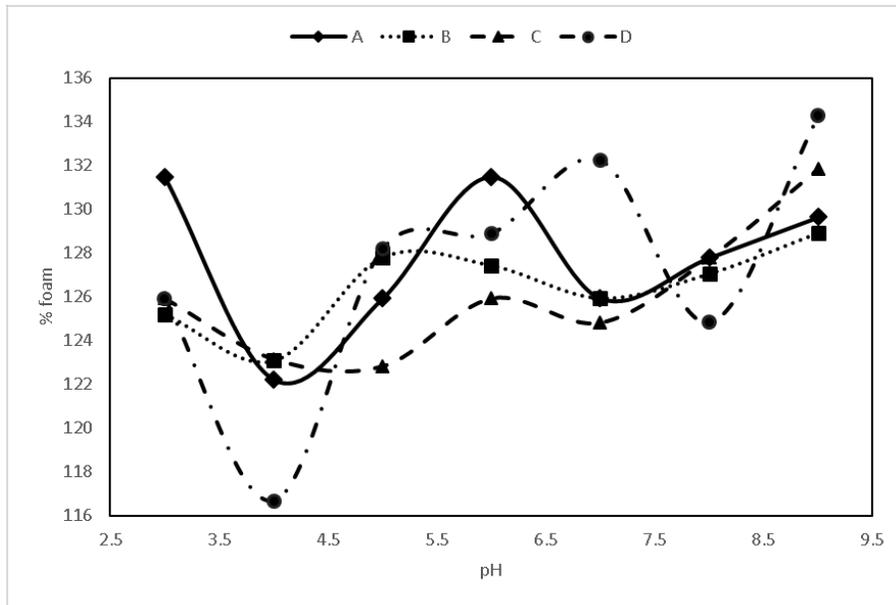


Figure 3. Foaming capacity of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) protein extracts obtained by different extraction processes (A, B, C, D), expressed as a percentage of the initial volume.

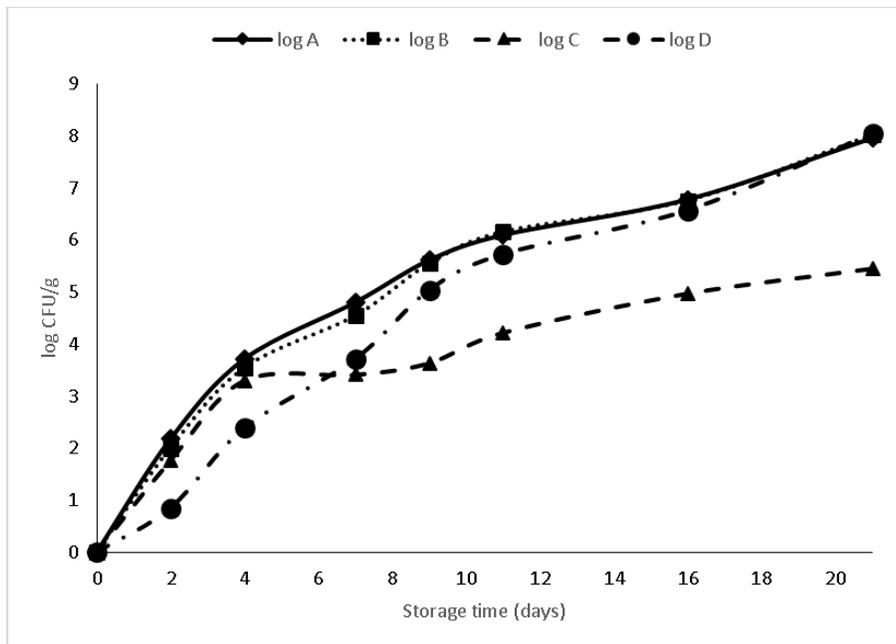


Figure 4. Total plate count of aerobic mesophiles during storage of the gels obtained from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) protein extracts A, B, C and D.

Anexo II.

8.1 Estándar 0.5 de McFarland (Ortez, 2005).

Reactivos:

1% Cloruro de bario (BaCl_2) anhidro

1% Ácido sulfúrico (H_2SO_4) puro y frío

Método de preparación:

1. Añadir 0.5mL de 1% BaCl_2 a 99.5mL de 1% de H_2SO_4 .
2. Revolver para mantener la suspensión.
3. Mezclar perfectamente antes de proceder al siguiente paso.
4. Distribuya 5mL de la disolución de McFarland en tubos de diámetros similares.

Utilizar los mismos tubos que se utilizarán para ajustar la densidad de las suspensiones antes de la inoculación.

5. Guardar los tubos en un lugar oscuro a temperatura ambiente

Es aconsejable contrastar los tubos con un fondo blanco y negro con bandas de diversos grosores al ajustar los inóculos.



Figura 27 – Tubos conteniendo el estándar 0.5 de McFarland (izquierda) y suspensión de *E. coli* (derecha) frente a una hoja con bandas horizontales.

8.2 Capacidad antimicrobiana del extracto.

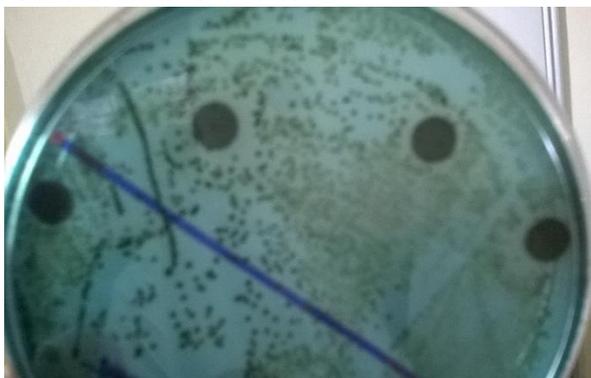


Figura 28 – Capacidad antimicrobiana del extracto de orégano sobre *Salmonella typhimurium* en agar Entérico Hektoen, frente a una densidad microbiana de 1.2×10^3 UFC/mL.

En la imagen es posible observar que, en una menor concentración celular de *Salmonella typhimurium* en Agar Entérico Hektoen existe un halo de inhibición, por lo que el extracto puede servir como un antimicrobiano para concentraciones bajas de microorganismos de este género.

8.3 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) en las muestras de gel.

Se evaluó que disolvente sería adecuado para lograr la determinación de CFT y evitar la interferencia de las proteínas presentes en la muestra. En la imagen de izquierda a derecha: blanco de reactivos, muestra con extracto-ácido tricloroacético 2%, muestra sin extracto-ácido tricloroacético 2%, muestra con extracto-agua y muestra sin extracto-agua.

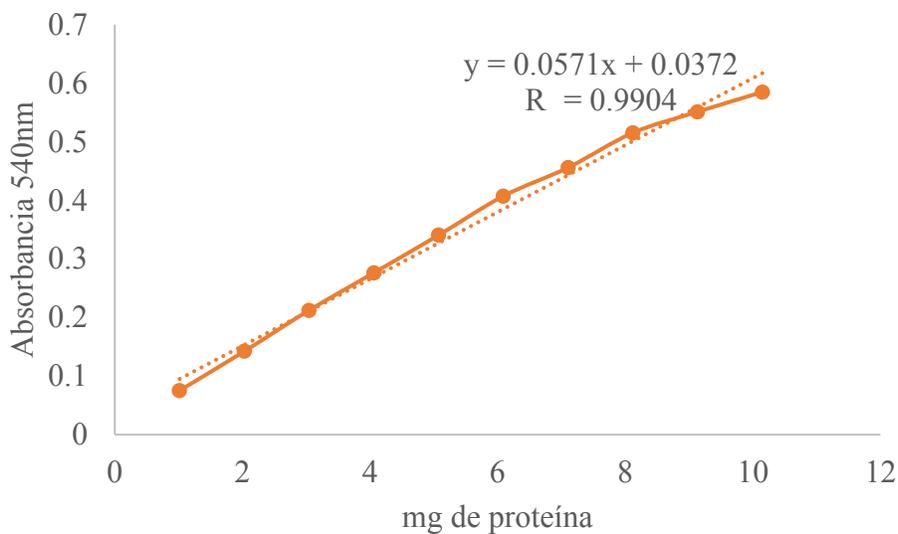
Además de las diferencias cuantitativas, se observa una menor precipitación de proteínas en el tubo de reacción al utilizar ácido tricloroacético y, por lo tanto, una menor perturbación de los datos debido a la turbidez.



Figura 29 – Determinación de CFT en muestras de gel empleando agua y ácido tricloroacético al 2%.

8.4 Curva de calibración para determinación de concentración proteica por la técnica de biuret.

Se utilizó albúmina bovina como estándar, en concentraciones de 1 a 10.1 mg.



8.5 Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales por la técnica de Folin-Ciocalteu.

Se utilizó ácido gálico como estándar en concentraciones de 32 a 224 μg

