

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DEL CONCENTRADO DE CALAMAR
GIGANTE (*Dosidicus gigas*)”**

Presentada por:

JUAN RODOLFO OMOTE SIBINA

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

LIMA – PERÚ
2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DEL CONCENTRADO DE
CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*)”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentado por:
Juan Rodolfo Omote Sibina**

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg. Sc. Beatriz Hatta Sakoda
PRESIDENTE

Dr. David Campos Gutiérrez
PATROCINADOR

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
Co-PATROCINADOR

Dra. Ana Aguilar Galvez
MIEMBRO

Mg. Sc. David Roldán Acero
MIEMBRO

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a mis padres Rina, Rodolfo, Carmen Rosa y Carlos, porque con sus enseñanzas y consejos, me han forjado y han logrado convertirme en la persona que soy. A mi esposa ya que es mi mano derecha y siempre está a mi lado para darme su apoyo y compañía.

Los amo y doy gracias Dios por tenerlos y por estar a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fuerza, constancia y determinación para lograr concluir con éxito este trabajo.

A mis padres Rina Sibina y Rodolfo Omote por su amor e incansable labor para que no me faltase nada, ya que sin ellos yo no estaría hoy acá.

A mis padres Carmen Rosa Omote y Carlos Barrenechea, que me enseñaron el significado de la gratitud, verdad, responsabilidad, así como, por todo su apoyo y compañía en todos los momentos especiales.

A mi esposa Cindy, por su constante apoyo, aliento, amor y comprensión durante todo el tiempo de estudio y elaboración de este trabajo de investigación. ¡Te amo! Isshoni Itsumademo.

A mis maestros; en especial al Dr. David Campos, Dra. Rosana Chirinos y Dra. Ana Aguilar por su guía, enseñanza y paciencia, así como, por brindarme las facilidades necesarias para lograr la realización de este trabajo de investigación.

Al Mg. Sc. David Roldán Acero, Dra. Fabiola Olivares, Ing. Andrés Molleda y M. Sc. Raúl Porturas por su amistad, consejos y constante apoyo para culminar este trabajo de investigación.

A Wendy Romero por su valioso apoyo, tiempo, disposición, dedicación y ganas de aprender durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	EL CALAMAR GIGANTE.....	3
2.1.1.	DISTRIBUCIÓN	4
2.1.2.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	7
2.1.3.	CAPTURA Y DESEMBARQUES.....	9
2.1.4.	ESTRUCTURA MUSCULAR Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL MANTO DE CALAMAR GIGANTE.....	10
2.2.	PROTEÍNAS MUSCULARES DEL CALAMAR GIGANTE.....	12
2.2.1.	PROTEÍNAS SARCOPLASMÁTICAS	13
2.2.2.	PROTEÍNAS MIOFIBRILARES.....	13
2.2.3.	PROTEÍNAS DEL ESTROMA	14
2.3.	CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE	14
2.4.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA.....	16
2.4.1.	PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS BASADOS EN DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD	16
2.5.	FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	18
2.6.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	19
2.6.1.	ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN	19
2.7.	FUNCIÓN DE DESEABILIDAD.....	22
III.	METODOLOGÍA.....	23
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	23
3.2.	MATERIA PRIMA	23
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	23
3.3.1.	MATERIALES	23
3.3.2.	EQUIPOS	24
3.3.3.	REACTIVOS	25
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS	26

3.4.1. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL CALAMAR GIGANTE.....	26
3.4.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE.....	26
3.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	27
3.4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL.....	27
3.4.5. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO NO PROTEICO	27
3.4.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	27
3.4.7. RENDIMIENTO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA	28
3.4.8. ELECTROFORESIS SDS-PAGE	28
3.4.9. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.....	29
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
3.5.1. ELABORACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO EN POLVO DE CALAMAR GIGANTE.....	30
3.5.2. EXTRACCIÓN ALCALINA DE LA PROTEÍNA DEL CALAMAR GIGANTE	32
3.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE	32
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
3.6.1. <i>SCREENING</i> O CRIBADO: DISEÑO DE PRIMER ORDEN	33
3.6.2. ESCALAMIENTO	34
3.6.3. OPTIMIZACIÓN: DISEÑO DE SEGUNDO ORDEN	34
3.6.4. FUNCIÓN DESEABILIDAD	35
3.6.5. VALIDACIÓN DEL MODELO	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1. CARACTERÍSTICAS DEL CALAMAR GIGANTE	37
4.2. CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE	39
4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO NO PROTEICO DEL CPCG	40
4.4. EXTRACCIÓN ALCALINA DE LA PROTEÍNA SOLUBLE DEL CALAMAR GIGANTE.....	42
4.4.1. <i>SCREENING</i> DE VARIABLES	42
4.4.2. ESCALAMIENTO	48

4.4.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO.....	49
4.4.4. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA.....	53
4.4.5. OPTIMIZACIÓN Y FUNCIÓN DE DESEABILIDAD	53
4.5. VALIDACIÓN DEL MODELO	55
4.6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE	55
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
VIII. ANEXOS	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición física del calamar gigante	8
Tabla 2.	Distribución de desembarque de calamar gigante	9
Tabla 3.	Composición química del manto del calamar gigante	11
Tabla 4.	Composición química proximal del concentrado de proteína de calamar gigante (CPCG)	15
Tabla 5.	Composición de aminoácidos en el CPCG	15
Tabla 6.	Diretrizes de Harrington para la transformación de los niveles Xi a la escala de deseabilidad	22
Tabla 7.	Factores experimentales y niveles evaluados en el diseño factorial 2K para la extracción de la proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante	34
Tabla 8.	Factores experimentales y niveles evaluados en el proceso de optimización por Diseño Central Compuesto para la extracción de la proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante	35
Tabla 9.	Resultados de evaluación de la calidad de acuerdo al método del índice de calidad (MIC)	38
Tabla 10.	Resultados de la evaluación sensorial al CPCG	39
Tabla 11.	Composición proximal de diferentes concentrados a partir de calamar gigante	41
Tabla 12.	Diseño arreglo factorial 2^k con repeticiones en el centro, variables codificadas (-1, 0, 1), respuestas experimentales y estimadas del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG	43
Tabla 13.	Análisis de variancia Diseño Factorial 2^k	44
Tabla 14.	Diseño central compuesto con repeticiones en el centro, variables codificadas, respuestas experimentales y estimadas del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG	50
Tabla 15.	ANVA Diseño Central Compuesto para la optimización de la extracción de proteína soluble del CPCG	51

Tabla 16. Valores óptimos de rendimiento de extracción de proteína soluble para el concentrado proteico en polvo de calamar gigante	54
Tabla 17. Valores de deseabilidad máxima por tratamiento con respecto al rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG	55
Tabla 18. Condición óptima del modelo cuadrático, respuesta estimada y experimental	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Calamar Gigante	3
Figura 2.	Distribución oceánica del calamar gigante	5
Figura 3.	Distribución del calamar gigante en la Costa Peruana año 2004-2011	6
Figura 4.	Morfología del calamar gigante: A) vista dorsal y B) vista ventral	8
Figura 5	Desembarque de calamar gigante entre los años 2007-2017 en TM	10
Figura 6	Flujograma para elaborar concentrado proteico en polvo de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	31
Figura 7	Diagrama de Pareto del rendimiento de extracción de proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante	45
Figura 8.	Gráfico de efectos principales de las variables independientes concentración de NaCl, tiempo, temperatura y relación CPCG:solvente	47
Figura 9.	Comparación del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG experimental y estimado para el modelo cuadrático	52
Figura 10.	Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización	52
Figura 11.	Superficie respuesta del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG en función de la Relación CPCG:solvente y Temperatura	53
Figura 12.	(A) Patrón electroforético: (1) estándar de pesos moleculares de amplio rango, (2) extracto proteico del CPCG, (B) perfil electroforético bidimensional.	58

RESUMEN

El calamar gigante es considerado como uno de los recursos pesqueros más importantes del país después de la anchoveta, si bien es cierto que, la forma más común de comercialización de esta especie es congelada, es necesario investigar acerca de alternativas de uso, una de ellas es el concentrado proteico de calamar gigante en polvo (CPCG), el cual presentó 88.05, 7.51, 1.26 y 1.63 % de proteína totales, humedad, grasas y cenizas, respectivamente, y de sus potencialidades dentro de la industria alimentaria. Dentro del grupo de proteínas presentes en el CPCG se encuentran las proteínas solubles las cuales han sido poco estudiadas, por lo que el objetivo de la investigación fue optimizar el proceso de su extracción, y posterior caracterización. Para ello, se empleó el método de extracción alcalina con NaOH y precipitación ácida, buscando obtener el mayor rendimiento de extracción de la proteína soluble. Se realizó un *screening* para determinar las variables que afectaban directamente el proceso de extracción haciendo uso de un diseño factorial 2^k , determinándose como variables significativas del proceso: la temperatura y la relación CPCG:solvente. La etapa de optimización de la extracción se realizó por medio de un diseño central compuesto utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta, encontrándose como condiciones óptimas de extracción a: temperatura de 71.9 °C y relación CPCG:solvente (agua) de 1:31.7 g/mL, manteniendo constante el pH a 10 y el tiempo de extracción de 35 min. La proteína soluble obtenida se liofilizó y se caracterizó obteniéndose un producto con un contenido de proteína total de 86% (bs), contenido de nitrógeno no proteico de 1 mg/g de muestra y, a través de electroforesis, se encontraron patrones de pesos moleculares de proteínas que corresponderían a tropomiosinas, troponinas y residuos de la cadena ligera de la miosina.

PALABRAS CLAVES: *Dosidicus gigas*, extracción alcalina - precipitación ácida, optimización, proteína soluble, electroforesis.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son uno de los compuestos esenciales de la dieta del ser humano al igual que los carbohidratos y las grasas ya que, es el principal componente estructural de todas las células y tejidos y además constituye la mayor proporción de sustancia de músculos y órganos (FAO, 2002). Por otro lado, representan uno de los componentes principales de los alimentos por sus propiedades tecnofuncionales y nutricionales, así, por ejemplo, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos, pero a la vez pueden jugar un papel muy importante, influyendo en las características tecnofuncionales, como la formación de emulsiones, geles, espumas o la absorción de agua o aceite. Además, las proteínas también constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales (Vioque y Millán, 2005).

El Perú es uno de los países pesqueros más importantes del mundo. El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es la especie cefalópoda más grande y pelágica más abundante en nuestro mar y se está posicionando, después de la anchoveta, como uno de los principales recursos pesqueros de nuestro país. El calamar gigante se exporta básicamente en filete, pero también como tubos, tiras, dados, alas y tentáculos, tanto fresco como cocido y congelado. El atractivo comercial de esta especie radica en su gran abundancia, su bajo precio, alto rendimiento (ya que se puede aprovechar hasta un 75% de sus partes después del eviscerado), bajo contenido de grasa y el color blanco de su carne (Cortés *et al.*, 2008). Todas estas características actualmente son aprovechadas por la industria para la elaboración de productos derivados o terminados del mismo.

Durante los últimos años, investigaciones reportan que las características nutricionales del calamar gigante han permitido utilizarla como materia prima en el procesamiento de productos con valor agregado como: congelados, conservas, fermentados, marinados, hidrolizados, etc. (Sánchez *et al.*, 2007).

La proteína soluble del calamar gigante podría llegar a ser un interesante producto empleado por la industria alimentaria, sin embargo, a la fecha aún son pocos los trabajos enfocados al estudio de la optimización de la extracción de la proteína de esta fuente, así como el de su caracterización a nivel físico-químico, siendo ello lo que ha motivado a desarrollar la presente investigación. Así el objetivo general del presente trabajo fue optimizar la extracción de las proteínas solubles del concentrado de proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) por el método de extracción alcalina con NaOH - precipitación ácida y su caracterización físico-química, y como objetivos específicos se plantearon:

- Determinar la influencia de las variables (concentración de NaCl, relación materia prima/solvente, pH, temperatura y tiempo de extracción) en el proceso de extracción de las proteínas del calamar gigante.
- Optimizar la extracción de la proteína del calamar gigante, mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR).
- Caracterizar por electroforesis SDS-PAGE y por electroforesis de dos dimensiones a la proteína del calamar gigante en función al rango de sus pesos moleculares y punto isoeléctrico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL CALAMAR GIGANTE

El calamar gigante cuyo nombre científico es *Dosidicus gigas*, es una especie pelágica y generalmente oceánica, cuya explotación no tiene una flota específica en el Perú (Rubio y Salazar, 1992). Esta especie, es uno de los calamares más abundantes en el mundo y juega un rol importante en el ecosistema de las aguas abiertas en la región sudeste del Océano Pacífico (Nesis, 1970).

El calamar gigante (Figura 1) presenta la siguiente clasificación taxonómica según Roper *et al.* (1984) y Álamo y Valdivieso (1987):

Phylum	: Mollusca
Clase	: Cephalopoda
Orden	: Decápoda
Suborden	: Theutoidea
Superfamilia	: Architeutacea
Familia	: Ommastrephidae
Género	: <i>Dosidicus</i>
Especie	: <i>Dosidicus gigas</i>

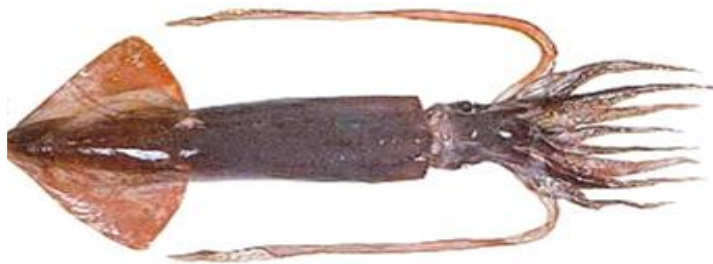


FIGURA 1. Calamar Gigante

FUENTE: Roper *et al.* (1984), Álamo y Valdivieso (1987)

Cubillos *et al.* (2004), mencionan los diferentes nombres comunes que recibe esta especie alrededor del mundo como son: Jumbo flying squid y Jumbo squid en inglés; Totano gigante pacificus y Totano australe en italiano; Tintenfisch y Reisenkalmar en alemán, Encornet géante en francés, calamar gigante, jibia, y pota en español.

El calamar gigante es una especie altamente migratoria y su biotopo principal es la zona oceánica del este del Océano Pacífico, principalmente en regiones donde la producción primaria es alta pero no máxima (Nesis, 1983).

El calamar gigante se mueve hacia la costa para alimentarse y desovar, principalmente en otoño, invierno y primavera, formando densas agregaciones a lo largo de la costa norte del Perú (Mariátegui y Taípe, 1996), se sabe también que dicho molusco, el cual habita en aguas peruanas es de corta vida. Su crecimiento corporal es rápido habiéndose reportado ejemplares de hasta 150 cm de longitud de manto. Se estima que la tasa promedio de crecimiento mensual es de 6 cm durante el primer año de su vida y de 2 cm durante el segundo año de vida (Roper *et al.*, 1984). De acuerdo a lo reportado por IMARPE (1993), los principales predadores del calamar gigante son los cetáceos tales como la ballena y el cachalote, además de lobos marinos, así como, otras especies mayores, menciona también que otras de las causas que incrementa la mortalidad natural de este recurso es el canibalismo de las hembras adultas que predan o se alimentan de los ejemplares machos de su misma especie después de la reproducción (IMARPE, 1993).

2.1.1. DISTRIBUCIÓN

El *Dosidicus gigas*, es una especie pelágica con amplia distribución en el este del Océano Pacífico, desde California (37° N) hasta el sur de Chile (47° S), y desde las costas del Norte y Sur América en los 125° W, por lo que Nesis (1983) afirma que las más grandes concentraciones ocurren en las afueras de las costas peruanas en el sur del hemisferio y en el Golfo de California en el norte del hemisferio, tal como se aprecia en la Figura 2.

Nesis (1970, 1983) menciona que su distribución hacia aguas al oeste y altas latitudes está limitada por la baja productividad de las masas de agua centrales y además por la necesidad de retornar al talud continental a desovar también debe de limitar su distribución.



FIGURA 2. Distribución oceánica del calamar gigante

FUENTE: Mariátegui y Taipe (1996)

La distribución de esta especie está asociada con los recursos pelágicos de la costa oeste de América, tales como: la anchoveta peruana (Chile y Perú), la anchoveta californiana en la costa oeste de Baja California, la sardina y caballa en el Golfo de California (Benitez y Valdivieso, 1982). De otro lado, Rubio y Salazar (1992), determinaron que la zona comprendida entre Paita y Cabo Blanco, frente a Punta Sal y Zorritos (Figura 3), es la de mayor concentración de calamar gigante en la costa peruana. Otra zona de considerable concentración de este recurso se observó en punta falsa a 75 millas náuticas (mn) de la costa. Áreas consideradas como regulares y pobres en concentración del recurso se encontraron frente a Chimbote a 120 millas náuticas de la costa. Además, definieron la distribución vertical del calamar gigante, identificando cardúmenes con ecogramas, entre los 3 y 270 metros de profundidad, los mismos que presentan un comportamiento diferente en el día y la noche. Durante el día, las mayores concentraciones se registraron entre 180 y 190 metros, y durante la noche, en periodos de cuarto menguante y luna nueva, entre los 30 y 50 metros. El estímulo luminoso de las lámparas provoca un ascenso de los cardúmenes hasta 10 y 30 metros de profundidad. Roper *et al.* (1984) afirman que, el calamar gigante es una especie que se encuentra tanto en aguas oceánicas como neríticas, con una distribución vertical que abarca desde la superficie hasta los 500 metros de profundidad.

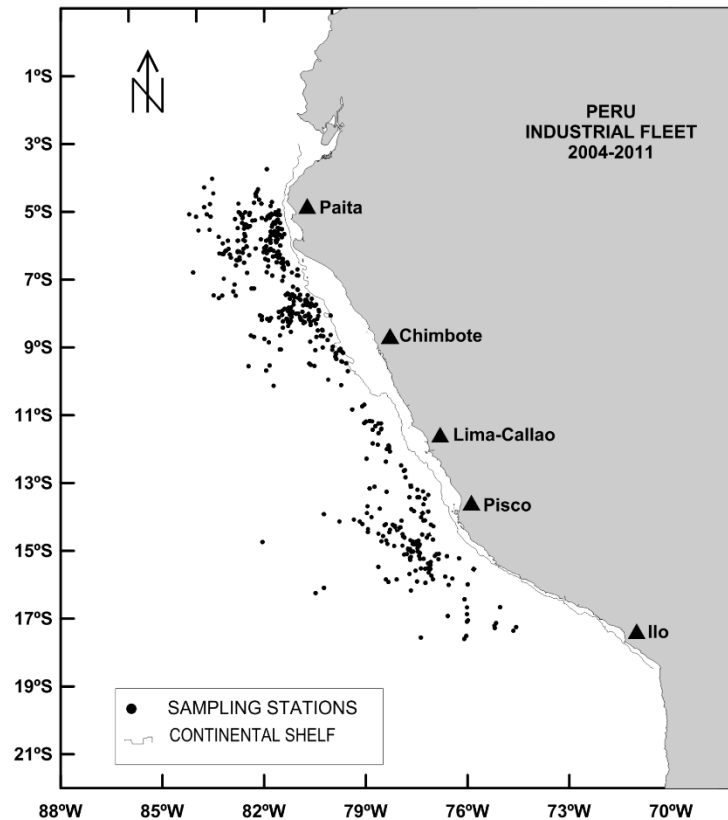


FIGURA 3. Distribución del calamar gigante en la Costa Peruana año 2004-2011

FUENTE: Alegre *et al.* (2014)

Nesis (1983) menciona que, para muchas otras especies de calamares, el *Dosidicus gigas* exhibe una considerable variabilidad en su distribución y abundancia relativa a los cambios de las condiciones ambientales marinas y que uno de los más importantes parámetros ambientales es la temperatura superficial del mar, además reporta que la temperatura del agua de mar en que vive este molusco se encuentra entre 15 y 28 °C, concluyendo que es una especie euritérmica. Además, menciona que, en el hemisferio sur se encontraron grandes concentraciones de esta especie entre los 17 y 23 °C y en el hemisferio norte entre los 25 y 28 °C. Muchos investigadores han encontrado una relación muy cercana entre la temperatura superficial del mar y los niveles de abundancia del *Dosidicus gigas*. Roper *et al.* (1984) menciona que, esta especie es más abundante a lo largo de la costa de América del Sur, en donde los ejemplares han sido encontrados en aguas a temperaturas entre 26 y 28 °C.

El calamar gigante se caracteriza por tener una alta abundancia, como los observados en los últimos años frente a Perú y otros países, relacionados con cambios en las condiciones

ambientales que propician su incremento poblacional o su disponibilidad. Se considera al calamar gigante como un recurso de oportunidad por cuanto no existe seguridad que la abundancia que se observa en la actualidad persista en el tiempo (Mariátegui y Taipe, 1996).

Nesis (1970 y 1983) postula que las migraciones horizontales del calamar gigante son muy extensas y se pueden dividir en dos tipos principales: migraciones pasivas, en las cuales se dejan a merced de las corrientes, entre ellos las masas de huevos fertilizados, paralarvas y juveniles (ocasionalmente adultos). Los juveniles se dispersan desde el área de desove a lo largo de una amplia área hacia el oeste y del Ecuador con el curso de las corrientes de vientos alisios y de frontera este. Mientras que las migraciones activas solo las realizan los adultos en proceso de maduración, quienes forman grandes y densos grupos de cientos de animales, viajando a una velocidad entre los 5-10 y 20-25 km/h (CIBNOR, 2003); el desplazamiento general de los adultos migrantes es hacia áreas más productivas y tras el periodo de alimentación vuelven a las áreas de desove costeras, madurando gradualmente (Nesis, 1970 y 1983).

2.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

IMARPE (1993), según sus investigaciones indica que, el calamar gigante es un molusco y como tal tiene manto y concha. Su concha es interna (luma) y pequeña. Tiene 10 brazos con ventosas. Es muy activo y veloz por excelencia, tiene el sistema de propulsión a chorro por ingreso y salida de agua por la cavidad del manto. El calamar gigante posee un manto bastante grande, robusto y grueso. Presenta aletas de forma romboidal cuyo ancho representa del 49 al 65 % de la longitud del manto; la longitud de las aletas representa del 41 al 49 % de la longitud del manto (Tabla 1).

Los caracteres distintivos del calamar gigante son: cartílago sifonal en forma T invertida, dos hileras de ventosas en los brazos, cuatro en la maza, conectivos bucales pegados a los bordes dorsales de los brazos IV (Roper *et al.*, 1984; Nesis, 1987), brazos atenuados y alargados (Figura 4), además una característica más es que a diferencia de los demás ommastrephidos presenta fotóforos pequeños en todo el cuerpo, pero no presenta fotóforos oculares e intestinales en el estadio de paralarva, pero dichos fotóforos si están presentes en juveniles y subadultos (Nigmatullin *et al.*, 2001, mencionado por CIBNOR,

2003). Además, Roper *et al.* (1984) sostiene que los extremos de los brazos están distantes del centro (especialmente en los adultos), sus extremidades son delgadas las cuales presentan ventosas, la membrana protectora del dorso se encuentra muy poco desarrollada. El cuarto brazo no presenta ventosas y posee membranas protectoras perforadas.

TABLA 1. Composición física del calamar gigante

COMPONENTE	PROMEDIO (%)
Cuerpo o Tubo	49.3
Aleta	13.4
Tentáculos	21.4
Vísceras	15.4

FUENTE: IMARPE – ITP (1996)

Nesis (1970), en las distribuciones de los tamaños de *Dosidicus gigas*, define tres rangos de longitudes de manto; individuos pequeños, con longitudes de manto entre 20 y 30 cm; individuos medianos, con longitudes de manto entre 35 y 45 cm; individuos grandes, con longitudes de manto mayores a 46 cm. con esta información y suponiendo que el calamar gigante un solo desove anual, asigna edades de 1-2, 2-3 y 3-4 años, respectivamente.

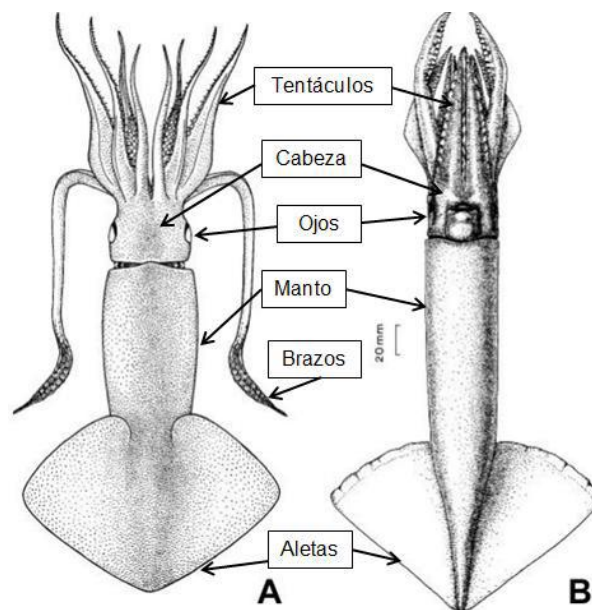


FIGURA 4. Morfología del calamar gigante: A) vista dorsal, B) vista ventral

FUENTE: Roper (1984) y Wormuth (1976)

2.1.3. CAPTURA Y DESEMBARQUES

La captura de calamar gigante a nivel nacional se da por flota artesanal e industrial, tanto nacional como extranjera. Para el año 2016 se tuvo un desembarque de 323 337 toneladas las cuales han sido destinadas en el 100% al consumo humano directo de acuerdo a la distribución según la Tabla 2 (PRODUCE 2017).

TABLA 2. Distribución de desembarque de calamar gigante

CONSUMO HUMANO	
DIRECTO	TM
Fresco	55050
Enlatado	492
Congelado	267775
Curado	20
Total	323337

FUENTE: PRODUCE (2017)

El desembarque total del calamar gigante reportado para el periodo 2007- 2016, se presenta en la Figura 5.

Se evidencia que en los últimos años la especie ha ido recuperando su biomasa, a excepción del año 2016 y 2017 donde presentaron sus valores de productividad más bajos con 323 337 y 295 975 TM respectivamente, pudiéndose atribuir a las condiciones principalmente a los cambios en la gradiente de temperaturas por los eventos del Niño y la Niña.

Según reportes de PRODUCE (2019), durante el 2018 el recurso mostró una leve recuperación logrando un incremento en la captura de 10.3% con respecto al 2017 (311 329 TM para el 2018, mientras que el 2017 fue de 295 975 TM).

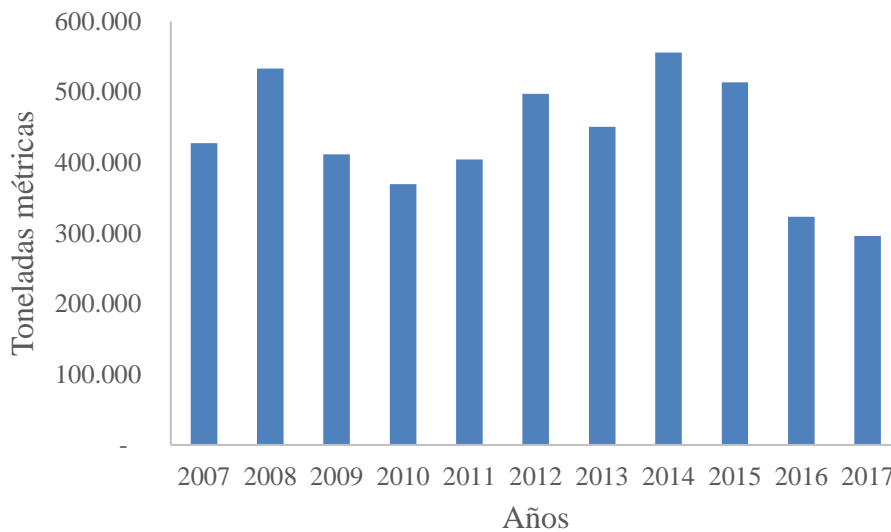


FIGURA 5. Desembarque de calamar gigante entre los años 2007-2017 en TM

FUENTE: PRODUCE (2017)

2.1.4. ESTRUCTURA MUSCULAR Y COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL MANTO DE CALAMAR GIGANTE

El tejido muscular en el manto, aleta y tentáculos está conformado por fibras circulares orientadas tridimensionalmente, constituida por un conjunto de fibras musculares orientadas en forma circular y radial, envueltas por tejidos conectivos que están conformados por las proteínas del estroma, las cuales tienen una estrecha relación con la mayor dureza y firmeza de su músculo (Otwell y Giddings, 1980).

Kugino y Kugino (1994) y Maza (2005) reportaron que, la piel que cubre el músculo del manto de calamar está conformada por 4 capas: las dos primeras capas del lado externo contienen entre ellas los pigmentos celulares (cromatóforos), estas pieles deben ser removidas en una operación manual antes de su almacenamiento debido a que los cromatóforos tienden a teñir el músculo lo que indica una pérdida de frescura. La tercera y cuarta capa están compuestas por tejido conectivo en forma de filamentos delgados. Estas deben ser separadas del músculo antes de la cocción debido a que sufren un excesivo encogimiento de las fibras de colágeno por la temperatura, principalmente en la cuarta capa (Maza, 2005).

De acuerdo a Sikorski (1994), la composición química del músculo de especies marinas, como es el caso del calamar gigante (Tabla 3), varía dependiendo de algunos factores como: sexo, talla, alimentación, temporada y localización de la captura entre otros. Existen muchas variaciones, en cuanto a composición química se refiere, de especie a especie, así como también, dentro de la misma especie; esta variación en la composición del músculo puede ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia. La composición indica que los compuestos nitrogenados no proteicos representan alrededor del 37% del total de compuestos nitrogenados incluida la proteína; esta fracción está compuesta principalmente de 300-1300 mg/100 g de óxido de trimetilamina (OTMA), así como de productos de su metabolismo, otras aminas como el cloruro de amonio, aminoácidos libres y sobre todo octopina en concentraciones de 450-1110 mg/100g, arginina (hasta 11600 mg/100 g), además de glicina, alanina, betaínas (compuesto derivado de la glicina) y nucleótidos, todos estos compuestos considerados como precursores de sabor. En cuanto a la composición lipídica del manto, se encuentra principalmente constituida por fosfolípidos y colesterol alrededor del 4%. La composición de ácidos grasos ha sido encontrada muy similar a la de los tejidos de peces magros o blancos como la lisa y el lenguado (Sikorski, 1994). La variación en la composición química del músculo de calamar puede ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia (Sikorski, 1994).

TABLA 3. Composición química del manto del calamar gigante

COMPONENTE	PROMEDIO (%)¹	PROMEDIO (%)²	PROMEDIO (%)³
Humedad	85.30	81.10	80.36
Grasa	1.40	1.10	0.68
Proteína	12.1	16.00	17.45
Ceniza	1.10	-	1.44
Sales Minerales	-	1.70	-

FUENTE: Pedreschi (1993)¹; IMARPE (1996)²; Bravo (2001)³

2.2. PROTEÍNAS MUSCULARES DEL CALAMAR GIGANTE

Licata (2007) define las proteínas como macromoléculas compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. La mayoría también contienen azufre y fósforo. Las mismas están formadas por la unión de varios aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. El orden y disposición de los aminoácidos en una proteína depende del código genético y ADN. Las proteínas constituyen alrededor del 50% del peso seco de los tejidos y no existe proceso biológico alguno que no dependa de la participación de este tipo de sustancias (Licata, 2007).

Las proteínas son los principales constituyentes del músculo y éstas comprenden aproximadamente el 20% del peso total del músculo, no obstante, casi el 80% restante es agua (Xiong, 2004). Como todo músculo, las proteínas del calamar gigante o en general de cefalópodos están constituidas por proteínas que se caracterizan desde el punto de vista de solubilidad y se pueden organizar en 3 grupos: proteínas miofibrilares, sarcoplasmáticas y del estroma. Las proteínas miofibrilares conforman la más abundante fracción de proteína, siendo este grupo de proteínas solubles en soluciones salinas concentradas (>2.0%), es responsable de muchas de las características funcionales de los alimentos cárnicos frescos y procesados (Xiong, 2004) La fracción de proteína sarcoplasmática está constituida por al menos 500 proteínas individuales, entre ellas se incluyen enzimas metabólicas, son solubles principalmente en agua y soluciones salinas de baja concentración (Xiong, 2004). La mayoría de las proteínas sarcoplasmáticas son de estructura globular con una alta densidad de cadenas laterales polares expuestas y cargadas (Xiong, 1997), representando el 25% de la proteína total (Pedreschi, 1993). Por otro lado, se sabe que las proteínas de regulación y proteínas estructurales, que representan menos del 1% de la fracción miofibrilar, también afectan las propiedades funcionales de las proteínas musculares debido a su interacción con la miosina y la actina.

Rodríguez (2002) menciona que son proteínas casi todas las enzimas, catalizadores de reacciones químicas en organismos vivos; muchas hormonas, reguladores de actividades celulares; la hemoglobina y otras moléculas con funciones de transporte en la sangre; anticuerpos, encargados de acciones de defensa natural contra infecciones o agentes extraños; los receptores de las células, a los cuales se fijan moléculas capaces de desencadenar una respuesta determinada; la actina y la miosina, responsables finales del

acortamiento del músculo durante la contracción; el colágeno, integrante de fibras altamente resistentes en tejidos de sostén (Rodríguez, 2002).

2.2.1. PROTEÍNAS SARCOPLASMÁTICAS

La fracción de proteínas sarcoplásmicas, representa cerca del 15 % del total de proteína del calamar (Ezquerro-Brauer, *et al.*, 2002, Gómez-Guillén, *et al.*, 2003, Sikorski y Kolodziejaska, 1986). Según Nakagawa *et al.* (1988), las proteínas sarcoplásmicas representan del 20 al 40% de las proteínas musculares totales, las cuales son globulares y presentan una solubilidad en agua y en soluciones de baja fuerza iónica o soluciones salinas diluidas. De igual manera, Ochiai y Chow, (2000) consideran que, los compuestos que se encuentran en el sarcoplasma o miógeno de organismos de origen marino incluyen proteínas solubles en agua y en disoluciones salinas diluidas, péptidos, aminoácidos, aminas, guanidina, purinas y urea, y a su vez tienen un rol fundamental en la regulación del metabolismo celular, directamente en la catálisis enzimática, osmorregulación y transporte celular. Además, son directa o indirectamente responsables de las características sensoriales como aroma, sabor y textura, tanto del tejido fresco como de los productos procesados. Asimismo, Watabe (1992) incluye dentro de las proteínas sarcoplasmáticas pigmentos proteicos del músculo respiratorio tales como mioglobina y citocromos y adicionalmente menciona que, las parvalbúminas también se encuentran en esta fracción. La fracción de proteína sarcoplasmática está constituida por al menos 500 proteínas individuales, incluyendo muchas enzimas metabólicas, solubles en soluciones salinas de baja fuerza iónica (fuerza iónica $\mu= 0-0.2$) (Xiong, 2004). La mayoría de las proteínas sarcoplasmáticas son de estructura globular con una alta densidad de cadenas laterales polares expuestas y cargadas (Xiong, 1997).

2.2.2. PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

Ruiz *et al.* (2003); Konno *et al.* (2003); Paredi y Crupkin (1997); Sikorski y Kolodziejaska (1986) mencionados por Palafox (2008), reportan que la miosina es la proteína más importante de las miofibrilares, debido a que participa de manera crucial en la contracción muscular gracias a su actividad de ATPasa; además esta proteína ha sido de gran interés por sus aplicaciones en ciencia y tecnología de alimentos y además posee la característica de ser soluble en soluciones salinas de alta concentración. Por otro lado, la paramiosina

es característica de los músculos de invertebrados y para el caso de calamar esta puede representar cerca del 14% del total de las proteínas miofibrilares (Sikorski y Kolodziejaska, 1986). Compuestas principalmente por actina, miosina, tropomiosina y actimiosina. Constituyen el 50-70% del contenido total de proteínas musculares por lo cual sus propiedades afectan enormemente a la calidad del músculo. La miofibrilla tiene actividad ATPasa, esta actividad en presencia de Mg^{2+} genera energía mecánica para la contracción muscular (Watabe, 1992).

2.2.3. PROTEÍNAS DEL ESTROMA

Estas proteínas constituyen aproximadamente el 3 % del total de las proteínas en teleósteos y cerca del 10 % en elasmobranchios. Estas proteínas son insolubles en agua, soluciones salinas. Son las proteínas responsables de la firmeza de la carne (tejido conectivo). Las proteínas de estroma están formadas principalmente por el colágeno y en menor proporción por la elastina (4:1) (Watabe, 1992).

2.3. CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE

Roldán y Lazo (2009) la definieron como una proteína concentrada en polvo, de consumo humano directo, con un valor biológico del 90%, con una concentración de 86% de proteína y 3% de grasas (40% de las cuales son omega 3 y 6). Se obtiene de la fracción muscular del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y en su proceso no se utiliza la piel, vísceras, cartílagos ni tentáculos y se elabora sin el uso de solventes ni agentes químicos de ninguna especie.

La Tabla 4 muestra la composición química proximal del concentrado proteico de calamar gigante (CPCG) en polvo. Estos resultados son similares, en cuanto al contenido de proteína, ceniza y humedad, a lo propuestos por el Comité Consultivo sobre Proteínas para el Concentrado Proteico de Pescado del tipo A (proteína mínima 75%, humedad, grasa y ceniza máximo 10, 0.5 y 15%) (Madrid *et al.*, 1994). La mayor diferencia con respecto a los valores anteriores se dio en el contenido de grasas de acuerdo a lo reportado por Roldán y Lazo (2006).

TABLA 4. Composición química proximal del concentrado de proteína de calamar gigante (CPCG)

COMPONENTE	PORCENTAJE (%)
Proteínas	86.04
Grasas	2.7
Cenizas	4.96
Humedad	6.3

FUENTE: Roldán y Lazo (2009)

En la Tabla 5 se muestra el contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales obtenido en el concentrado proteico de calamar gigante reportado por Roldán y Lazo (2005).

TABLA 5. Composición de aminoácidos en el CPCG

AMINOÁCIDOS ESENCIALES	RESULTADOS
Lisina	7.9 g/100 g
Triptófano	0.94 g/100 g
Treonina	4.1 g/100 g
Valina	4.3 g/100 g
Metionina	3.0 g/100 g
Isoleucina	4.8 g/100 g
Leucina	7.9 g/100 g
Fenilalanina	3.8 g/100 g
Histidina	2.1 g/100 g
Total	38.84 g/100 g
NO ESENCIALES	
Arginina	6.7 g/100 g
Ácido aspártico	9.5 g/100 g
Serina	4.3 g/100 g
Ácido glutámico	14.5 g/100 g
Prolina	3.5 g/100 g
Glicina	4.0 g/10 g
Alanina	5.0 g/100 g
Cisteína + Cistina	1.06 g/100 g
Tirosina	3.2 g/100 g
Total aminoácidos	90.6 g/100 g
R= Esenciales/Total x 100	42.87%

FUENTE: Roldán y Lazo (2009)

2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Una de las alternativas para poder extraer la proteína en materias primas provenientes de recursos hidrobiológicos es la de realizar la extracción con agua de los compuestos no proteicos, ésta se efectúa a través de una insolubilización de las proteínas por efecto del tratamiento térmico. El vapor permite el arrastre de componentes volátiles responsables de olores y sabores desagradables como son los ácidos grasos de cadena corta y sus derivados oxidados. Sin embargo, se produce una intensa disminución de las propiedades interfaciales acuoso-oleosas y agua-aire, y también de la solubilidad. El calor prolongado también puede dar lugar al desarrollo de colores oscuros y sabores amargos como resultado de reacciones de Maillard. Las técnicas de extracción son idénticas a las usadas anteriormente (McAnelly, 1964; mencionado por Vioque *et al.*, 2001).

2.4.1. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS BASADOS EN DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD

Las proteínas en disolución muestran cambios significativos de su solubilidad en función del pH, fuerza iónica, propiedades dieléctricas del disolvente y la temperatura. Estas variables que son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos, característica que determina su comportamiento como electrolito y propiedades (Ramírez *et al.*, 2007; citado por Urrutia, 2010).

a. Extracción alcalina y precipitación isoeléctrica

Este procedimiento se basa en la solubilización de las proteínas en un medio alcalino; la solución se filtra y se centrifuga para eliminar los polisacáridos insolubles (incluye la fibra). La proteína solubilizada se precipita en su punto isoeléctrico donde se eliminan los carbohidratos solubles y sales. Se obtiene un aislado con no menos de 90% de proteína (Fennema, 2008). Por otra parte, Fidantsi y Doxastakis (2001) reportan que mediante este método de extracción proteica se obtiene principalmente globulinas y una considerable cantidad de polisacáridos, pero no albúminas.

Según Ramírez *et al.* (2007); citado por Urrutia (2010) este método consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, comúnmente se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) para la extracción alcalina, posteriormente se procede a la precipitación isoeléctrica (solubilidad mínima de las proteínas a pH alrededor de 4.5). Generalmente el procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación de 1:10, ajustando el pH a 9 con NaOH 0.1 N. La extracción se realiza agitando la suspensión por 45 minutos a temperatura ambiente. Para separar la proteína extraída del residuo, el extracto se centrifuga a 10 000 rpm. La precipitación de las proteínas aisladas se realiza ajustando el pH con HCl 0.1N. Las proteínas precipitadas se recuperan por centrifugación, posteriormente se procede a lavar preferentemente dos veces con agua destilada.

b. Solubilización y precipitación por salado de las proteínas

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las sales de iones divalentes tales como el $MgCl_2$ y el $(NH_4)_2SO_4$, son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl, KCl y NH_4Cl . Las capacidades de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas están en función de su fuerza iónica que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones aportados por la sal. El efecto de la solubilidad por salado está causado por cambios de tendencia a la ionización de los grupos -R disociables de la proteína (Nelson y Cox, 2001).

Por otra parte, a medida que aumenta la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, a una fuerza iónica suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución, efecto llamado insolubilización por salado. La base fisicoquímica de la insolubilización por salado es muy compleja; uno de los factores que concurren en ella es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína reduciendo la solubilidad (Nelson y Cox, 2001).

c. Fraccionamiento con disolventes

La adición de disolventes orgánicos neutros miscibles con el agua, particularmente etanol y acetona, disminuye la solubilidad de la mayoría de las proteínas globulares en el agua, de tal manera que precipitan. El estudio cuantitativo de éste efecto muestra que la solubilidad de la proteína a un pH y fuerza iónica determinados está en función de las constantes dieléctricas del medio. Puesto que el etanol posee una constante dieléctrica menor que la del agua, su adición a una disolución acuosa de proteína incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos -R de la proteína. Como resultado las moléculas de proteína tienden a agregarse y precipitan. Las mezclas de proteínas pueden separarse basándose en las diferencias cuantitativas de su solubilidad en mezclas frías de etanol-agua y de acetona-agua. Una desventaja de este método es que al poder estos solventes desnaturalizar a las proteínas a temperaturas superiores, las temperaturas de trabajo deben mantenerse bajas (Nelson y Cox, 2001).

2.5. FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Voet y Voet (2006) explicaron que, los extractos proteicos pueden quedar expuestos a agentes que la puedan dañar de forma irreversible. Estos agentes o factores deben controlarse con cuidado en todos los casos de purificación, ya que de lo contrario puede reducirse en gran medida, o incluso anularse, el rendimiento de la proteína extraída o purificada. Estas pueden ser separadas basadas en algunas propiedades tales como tamaño o carga, este proceso es denominado fraccionamiento.

Las primeras fases en este proceso suelen utilizar diferencias en la solubilidad de las proteínas. Diversos factores pueden afectar esta solubilidad; en particular, la composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); la estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína (Voet y Voet, 2006).

Respecto a las condiciones del entorno de las proteínas, los principales factores que pueden afectar su solubilidad son la temperatura; la constante dieléctrica del medio; el

pH del mismo; y la fuerza iónica. La precipitación salina de las proteínas es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína-agua porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar ésta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas (Voet y Voet, 2006).

2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie respuesta (MSR) es una técnica usada en la investigación de procesos complejos, ha sido aplicada exitosamente en la optimización de condiciones de procesamiento, como relación materia prima/solvente, temperatura, y tiempo de procesos (Kim *et al.*, 2001), la MSR es también empleada en la evaluación efectiva de factores, así como en la construcción de modelos para estudiar interacciones de variables independientes, y la generación de modelos matemáticos muy precisos que pueden describir procesos en general (Shao *et al.*, 2007)

Es la representación geométrica de la función objetivo o más propiamente del modelo matemático obtenido (Ayala y Pardo, 1995). La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema (Montgomery, 2002).

2.6.1. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN

Ayala y Pardo (1995), mencionan que para optimizar un proceso o producto se requiere de una estrategia adecuada para encontrar valores óptimos. Para llegar a esta meta se sigue 3 etapas:

a. Etapa I: Screening o Cribado

Esta etapa es identificar aquellas variables que verdaderamente aumenten la eficacia de un proceso. Al inicio de un proceso de optimización, cuando no se tiene un buen conocimiento del comportamiento del proceso, la lista de variables que pueden influir en el proceso son muchas (Ayala y Pardo, 1995), por lo que es necesario identificar a las más relevantes. Los diseños más usados en esta etapa son los diseños factorial 2^k , factorial fraccionado y el diseño de Plackett y Burman.

Montgomery (2005) señala que el primer paso en la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre “y” y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \dots\dots\dots(1)$$

En esta clase de diseños de primer orden se tiene:

- Diseños factoriales 2^k
- Fraccionales de la serie 2^k
- Diseños simplex.
- Diseños Placket – Burman.

b. Etapa II: Escalamiento

El escalamiento se da cuando se tiene evidencia que la región óptima se encuentra lejos de los experimentos iniciales (*screening*), o para confirmar una hipótesis previa (según experiencias del investigador o según el análisis del efecto de curvatura en la etapa *screening*). Esta etapa consiste en escalar sucesivamente hacia la región óptima hasta llegar ubicarla. Existen varios métodos entre los cuales destacan el método de pendientes ascendentes o descendentes y el método de búsqueda simple (*Simplex Search*). Estos métodos permitirán acercarse a la denominada “región experimental de respuesta

estacionarias”, es decir, a una zona en la cual ya no es posible mejorar las respuestas por las técnicas mencionadas. En esta situación los efectos cuadráticos toman importancia y el uso de modelos de segundo orden es necesario para describir dicha región (Ayala y Pardo, 1995).

c. Etapa III: Optimización final

En la región óptima los efectos de segundo orden son mayores en valor absoluto a los efectos de primer orden, lo que indica que esta región puede describirse apropiadamente por modelos matemáticos de segundo orden. Los diseños experimentales más apropiados para estos casos son los diseños rotables y los diseños compuestos (Ayala y Pardo, 1995).

Dentro de los diseños rotables de segundo orden se incluyen:

- Diseño central compuesto.
- Diseño equirradial.
- Diseño Box Behnken.

Debe usarse un polinomio de mayor grado cuando existe curvatura en el sistema, un modelo de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \dots \dots \dots (2)$$

Donde los β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los β_{ii} son los coeficientes para los términos cuadráticos puros, los β_{ij} son los coeficientes para los términos de un producto cruz y ε es el término del error aleatorio. Los términos cuadráticos puros y los de producto cruz son de segundo orden (Montgomery, 2005).

El diseño para ajustar el modelo de segundo orden como el de Box Behnken se forman combinados factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser muy eficientes en términos del número requerido de corridas, y son rotables o casi rotables (Montgomery, 2002) e incluye tres variables y tres niveles factoriales. En los niveles codificados y no codificados de las variables independientes y el diseño

experimental se dan valores. El valor codificado representa el punto central de las variables y se repite para el error experimental y los valores ± 1 son los puntos factoriales (Radojković *et al.*, 2012).

2.7. FUNCIÓN DE DESEABILIDAD

Harrington (1965) desarrolló el concepto de función de deseabilidad como una solución para combinar las respuestas de múltiples factores en una función y consiste en definir una función de deseabilidad para cada una de las variables de respuesta y, a partir de estas últimas, se define una deseabilidad global, con lo que el problema de optimización multivariado se convierte en un problema de optimización univariado ya que se desea maximizar la deseabilidad global para obtener un punto óptimo. Según Bacio (2007), la función de deseabilidad implica transformaciones de cada una de las variables de respuesta estimadas $\hat{y}_i(x)$ a un valor de deseable $d_i(x)$, donde $0 \leq d_i(x) \leq 1$. Si $d_i(x) = 1$, significa que la correspondiente respuesta estimada $\hat{y}_i(x)$ alcanza su máximo valor deseable; si $d_i(x) = 0$, la respuesta toma un valor no deseado.

En la Tabla 6 se presenta un resumen abreviado para la transformación de los niveles X_i a la escala de deseabilidad. Rudnykh y López (2018) mencionan que la forma de la función depende de si el objetivo de investigación es maximizar la respuesta, o limitar el rango de valores.

TABLA 6. Directrices de Harrington para la transformación de los niveles X_i a la escala de deseabilidad

d_1	Equivalente de la calidad de X_1
0.00	Completamente inaceptable
0.00- 0.30	Inaceptable
0.30 – 0.40	Límite de aceptación
0.40 – 0.63	Aceptable pero mediocre
0.63 – 0.80	Aceptable y bueno
0.80 – 1.00	Aceptable y excelente
1.00	Mejor adicional no tiene valor apreciable

FUENTE: Rudnykh y López (2018)

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del área de Biotecnología Industrial y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) y Laboratorios de Procesos de Recursos Hidrobiológicos de la Facultad de Pesquería, ambos en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIA PRIMA

El manto de calamar gigante se adquirió en el Terminal Pesquero de Villa María del Triunfo, fue acondicionada en cajas de poliestireno con hielo molido y mantenido a una temperatura entre 0-3 °C durante su traslado.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. MATERIALES

- Bagueta.
- Beakers de 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Bolsas con cierre hermético.
- Cubetas de vidrio UV/VIS.
- Cronómetro.
- Embudo Büchner.
- Espátula y cuchara.
- Fiolas de 10, 50, 100 mL.
- Magnetos.

- Matraz Kitasato de 250 mL.
- Matraz de Erlenmeyers de 50 y 100 mL.
- Micropipetas (Brand Transferpette) de 0.5-10; 20-200; 100–1000; 500– 5000 μ L.
- Papel de aluminio.
- Papel film.
- Papel filtro Whatman N° 1.
- Parafilm.
- Placas Petri desechables.
- Probetas de 50, 100, 500 y 1000 mL.
- Tips para micropipeta de 10, 50, 200, 1000 y 5000 μ L.
- Tubos tipo Falcon de 50 mL.
- Tubos eppendorf de 1, 2, 5 mL.
- Tubos de ensayo de 5 ml.

3.3.2. EQUIPOS

- Agitador orbital (Boeco, modelo OS-20, Alemania)
- Agitador magnético (Cat, modelo M6, Alemania)
- Agitador vortex (VELP scientific, modelo F202A0175, Alemania)
- Balanza analítica (Ohaus Adventurer, NJ, USA).
- Balanza de humedad infrarroja (MB 64M, USA)
- Baño maría con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania)
- Bomba de vacío (Vacumbrand ME2C, Alemania).
- Cámara de deshidratado (Klimatechnik, modelo DSHE-3.0/FD, Perú)
- Centrifuga (Hettich Zentrifugen – Mikro 220R Rotofix 32, Alemania).
- Congeladora -20°C (Electrolux, modelo H300, Canadá).
- Congeladora -80 °C (Panasonic, modelo Pro series)
- Densitómetro (GS-900TM, Biorad, USA)
- Estufa (Mettler, modelo BE20, Alemania)
- Espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 20, USA).
- Fuente de energía (Hofer, PS600, Holliston MA, USA)
- Liofilizador (Labconco Freezone 4.5, USA)

- Potenciómetro digital (Thermo Orion, modelo Star 211, USA).
- Refrigeradora (LG, modelo, GR-482BEF, Corea).
- Sistema de electroforesis SE600X (Hoefler, Holliston MA, USA)
- Sistema de Isoelectrofocalización IEF100 (Hoefler, Holliston MA, USA)
- Sistema de agua Milli-Q (Merck -Millipore, Alemania)

3.3.3. REACTIVOS

- 3-((3-colamidopropil)-dimetilamonio)-propano sulfonato) (CHAPS) (Merck, Alemania)
- Acetona (J.T. Baker, USA)
- Aceite Mineral (Bio-Rad, USA)
- Ácido acético glacial (Merck, Alemania)
- Ácido clorhídrico al 37% pureza (J.T. Baker, USA)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Calbiochem, USA)
- Acrilamida para electroforesis, grado BM (Sigma Aldrich, India)
- Ácido sulfúrico p.a. 98 - 99 % pureza (Fermont, México)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Aldrich, India)
- Alcohol etílico (J.T. Baker, USA)
- Anfolitas Bio-Lyte 5/8 40% (Bio –Rad, USA)
- Azul de bromofenol (Merck, Alemania)
- Azul brillante de coomassie G 250 para electroforesis (Merck, Alemania)
- Bis-Acrilamida (Sigma Aldrich, India)
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de Potasio (J.A. Elmer, Perú)
- Dithiothreitol (DTT) (Merck, Alemania)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich, India)
- Folin-Ciocalteau 2N (Merck, Alemania)
- Formaldehido (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Glicerol (Calbiochem, USA)

- Glicina (Sigma Aldrich, India)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker, USA)
- Inhibidor de proteína libre de EDTA (Roche, Suiza)
- Iodocetamida (Sigma Aldrich, India)
- IPG strips (ReadyStrip, Bio-Rad, USA)
- Marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad, USA)
- Mercaptoetanol (Merck, Alemania)
- Metanol (J.A. Elmer, Perú)
- Nitrato de plata (J.A. Elmer, Perú)
- Persulfato de amonio p.a. 98,0 % de pureza (Omnipur, USA)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Merck, Alemania)
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado p.a. 99,0 % de pureza (Merck, Alemania)
- Tetrametiletano-1,2-diamina (TEMED) para electroforesis (Sigma Aldrich, India)
- Tisosulfato de sodio (Merck, Alemania)
- Tioúrea (Sigma Aldrich, India)
- Tris Base (Calbiochem, USA)
- Tris-HCl para electroforesis 99,6 % de pureza (J. T. Baker, USA)
- Urea (Calbiochem, USA)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL CALAMAR GIGANTE

Se realizó de acuerdo al método del índice de calidad (MIC) propuesta por Ordoñez y Plácido (2004) (Anexo 1), para determinar el grado de frescura inicial del calamar gigante.

3.4.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE

Para evaluar la calidad sensorial del concentrado de calamar gigante en polvo se utilizó la evaluación sugerida por Lazo (2006) (Anexo 2).

3.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

Se realizó siguiendo el método 950.46 de la AOAC (2005). Método de la estufa a 100°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL

Se realizó según el método 984.13 de la AOAC (2005). Método de Kjeldahl. El factor de conversión de proteína usado fue de 6.25. Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.5. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO NO PROTEICO

El nitrógeno no proteico (NNP) se determinó de acuerdo al procedimiento establecido por Hashimoto *et al.* (1979). Para ello, se tomaron 20 gramos de proteína concentrada en polvo de calamar gigante y se adicionaron a 200 mL de buffer fosfato 0.05 M, pH 7.5 preparada con 15.6 mM Na₂HPO₄ y 3.5 mM KH₂-PO₄, se homogenizó bajo agitación constante a una temperatura entre 3 y 4 °C. El homogenizado fue centrifugado a 5000 g por 15 minutos. Al precipitado se le agregaron 200 mL más de buffer fosfato y se realizó el procedimiento anterior. Terminado se le adicionó ácido tricloroacético al 5% para separar la proteína sarcoplasmática de los NNP y estos fueron determinados por medio del método Kjeldahl (AOAC, 2005).

3.4.6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Se utilizó el método de Lowry (1951). Este método está basado en la reacción con cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por el complejo proteína – cobre. La reacción del cobre Cu⁺² bajo condiciones alcalinas forma enlaces y originan complejos de color violeta, estos complejos cupoproteicos reducen al reactivo Folin Ciocalteau el cual vira a color azul oscuro y cuya intensidad depende proporcionalmente de los aminoácidos tirosina y triptófano.

Para la determinación se prepararon 3 soluciones denominadas: reactivo A: solución de Na₂CO₃ al 2% y NaOH 0,1M. reactivo B₁: solución al 0.5% de CuSO₄.5H₂O, Reactivo

B₂: solución de Tartrato de sodio al 1% y reactivo C: es la mezcla del Reactivo B₁, B₂ con el Reactivo A. Se usó el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N para lograr la reacción.

Para la cuantificación se midió la absorbancia de la reacción a 750 nm de acuerdo a lo recomendado por Lowry *et al.* (1951). Los resultados fueron expresados en mg proteína/g de muestra, tomando en consideración una curva estándar de albúmina (Anexo 3). La reacción se llevó a cabo tomando un alícuota de 800 µL de muestra y mezclada con 4 mL de Reactivo C, se dejó reposar por 10 minutos, pasado este tiempo se agregó 400 µL de reactivo Folin 1N, se dejó reposar por 20 minutos más y se procedió con la lectura de la absorbancia.

3.4.7. RENDIMIENTO DE PROTEÍNA EXTRAÍDA

El cálculo del rendimiento de proteína extraída se realizó dividiendo la cantidad de proteína soluble entre la proteína total obtenida por el método Kjeldahl y multiplicado por 100. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.4.8. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Las proteínas extraídas fueron analizadas por medio de su peso molecular utilizando el protocolo de Laemmli (1970), el cual se basa en el uso de agentes desnaturizantes como el SDS (dodecil sulfato de sodio) para lograr la disociación de las proteínas en subunidades, este agente desnaturizante tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa:masa constante, logrando que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína quede enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS facilitando de esta manera la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Para ello se utilizó un gel de concentración preparado con un mix de acrilamida y bisacrilamida al 5% (%T= 12.5, %C= 5.1) a pH= 6.8, el cual fue vertido en la parte superior de una solución de gel de separación de acrilamida y bisacrilamida al 12.5% (%T= 40, %C= 3.3) a pH= 8.8. Para realizar la corrida se tomó 5 µL de proteína liofilizada con concentración de 1 mg/mL y se agregaron a 10 µL de buffer desnaturizante (Tris-HCl 0.5M - pH 6.8), preparada con SDS 10% (1.02 mL), Azul de bromofenol 0.1% (0.255 mL) y Glicerol (0.510 mL), Tris-HCl 0.5M (0.610 mL) previamente regulado a pH 6.8 con NaOH 1M y agua destilada (2.52 mL), una vez

realizada la mezcla se le añadió β -mercaptoetanol (2.5 μ L) y fue llevada a 100 °C por 5 minutos. La muestra se sembró en el gel de concentración y se puso en funcionamiento el equipo de electroforesis en rampas: 1era rampa 100V x 70 minutos, 2da rampa 120V x 100 min, 3era rampa 140V x 120 minutos en 4 L de buffer de corrida (Tris-glicina 1X–pH 8.3), preparado con Tris HCl (12 g), glicina (64 g) y SDS (4 g).

Culminada la electroforesis se procedió al revelado por medio de la técnica de tinción en plata de acuerdo a Blum *et al.* (1987), esta metodología es más sensible que la de azul de coomasie, para ello, los geles se fijaron durante la noche (overnight) en etanol al 40% y ácido acético al 10%, luego se lavaron durante 20 minutos en etanol al 30%, 20 minutos en etanol al 20% y finalmente 20 min en agua Milli-Q. Una vez lavados los geles se sensibilizaron en tiosulfato de sodio 0.02% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) durante 1 minuto y teñido en una solución de plata (0.2% AgNO_3 y 0.02% formaldehído) durante 20 min. Los geles se revelaron con carbonato de sodio 3% (Na_2CO_3) y tiosulfato de sodio 0.0005% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) durante 3 minutos, logrado el revelado se fijó en una solución de glicina 11%.

3.4.9. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional el cual consistió en dos etapas de separación: isoelectroenfoque IEF (primera dimensión) y SDS-PAGE (segunda dimensión), siguiendo el procedimiento descrito por Pedreschi (2009).

a. Isoelectroenfoque (primera dimensión)

Para la identificación del tipo de proteínas por el método de isoelectroenfoque (IEF) se utilizaron tiras o strips (IPG) de 18 cm secos inmovilizados con un rango de pH 3-10. Los strips o tiras fueron sometidos a una rehidratación pasiva overnight y cubiertas con aceite mineral, pasado este tiempo se lavaron las tiras con agua MilliQ y se cargaron los pozos con 50 μ L de buffer de rehidratación (úrea 7M, tiourea 2M, 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1- propanosulfato (CHAPS) 4% (v/v), azul de bromofenol, DTT (Dithiothreitol) 75 mM, buffer de anfólitos 40%) conteniendo 5 μ g de proteína y se cubrieron con aceite mineral para evitar la deshidratación por efecto del flujo de corriente. El equipo (Hoefer IEF 100) se programó de acuerdo a las siguientes rampas (3 horas 45 min a 250 V, 6 horas a 1000 V, 3 horas a 8000 V y 240000 V horas), culminada la etapa

de IEF se equilibraron los strips con solución de equilibrado I (2% DTT) por 15 minutos y en solución de equilibrado II (2.5% iodoacetamida) por otros 15 minutos.

b. SDS-PAGE (segunda dimensión)

Para esta etapa se empleó el gel de separación, el cual fue preparado tal como es descrito en el acápite 3.4.8. Una vez polimerizado el gel de separación se procedió a colocar el IPG strip sobre el gel y se cubrió con agarosa. La corrida se realizó en tres rampas de 1era rampa 100V x 70 minutos, 2da rampa 120V x 100 min y 3era rampa 140V x 120 minutos. El revelado del gel de la electroforesis se realizó siguiendo lo descrito por Blum *et al.* (1987) tal como se detalla en el apartado 3.4.8.

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología utilizada para llevar a cabo la investigación se dividió en 3 etapas las cuales se detallan a continuación:

3.5.1. ELABORACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO EN POLVO DE CALAMAR GIGANTE

El acondicionamiento de la materia prima para la obtención del concentrado proteico de calamar gigante se muestra en la Figura 6 y se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Roldán y Lazo (2009) con algunas modificaciones.

En el laboratorio el manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) fue evaluado sensorialmente según el método MIC propuesto por Ordoñez y Plácido (2004) para determinar el grado de frescura, la materia prima se trasladó en cajas isotérmicas con hielo a una temperatura aproximada de 3 °C. Luego se lavó el manto en agua con hielo, a una temperatura entre 0 y 5 °C, con la finalidad de eliminar los restos de arena y probables contaminantes físicos, seguidamente se removió la piel externa de forma manual, una vez limpio el manto se cortó en cubos de aproximadamente 2 centímetros de lado y se llevó al proceso de cocción a una temperatura de 85 °C por un tiempo de 10 minutos en una relación manto: agua destilada de 1:2. Pasado ese tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se molió en un molino con criba de 5 mm.



FIGURA 6. Flujograma para elaborar concentrado proteico en polvo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Obtenido el manto cocido y molido del calamar gigante se procedió a realizar un segundo lavado por inmersión en una relación de 1:2 (manto: agua) por un tiempo de 10 min, este lavado se realizó por triplicado. Terminada esta etapa el manto cocido, molido y lavado se centrifugó para eliminar el exceso de agua; posteriormente fue secado en un secador

de bandejas estático a una temperatura de 65 °C por un tiempo de 4 horas. Una vez finalizado el secado se molió la muestra y se envasó en bolsas de polietileno. El concentrado se conservó a 0 °C hasta las pruebas respectivas. Al producto final se le denominó concentrado proteico de calamar gigante (CPCG) en polvo.

3.5.2. EXTRACCIÓN ALCALINA DE LA PROTEÍNA DEL CALAMAR GIGANTE

Se utilizó la metodología propuesta por Fritz *et al.* (2011) con ligeras modificaciones el mismo que se detalla a continuación:

a. Extracción alcalina sólido-líquido: La proteína del concentrado de calamar gigante se extrajo utilizando una combinación de las siguientes variables: Concentración de cloruro de sodio (M), relación CPCG:solvente (g/ml), temperatura (°C) y tiempo de extracción (min), en función al diseño experimental estadístico empleado. La extracción de la proteína se llevó a cabo bajo condiciones alcalinas (los pH de las mezclas se regularon con NaOH 1N) aplicado a 2 g de muestra en un erlenmeyer de 500 mL. La mezcla, se mantuvo en agitación constante (200 rpm) en un baño maría, siguiendo las condiciones de extracción ofrecidas por el diseño estadístico.

b. Centrifugación: Transcurrida la extracción alcalina la solución obtenida se centrifugó a 4000 g por 20 minutos a la temperatura de 10 °C, recuperándose el sobrenadante.

c. Filtración. El sobrenadante obtenido se filtró en papel Whatman N° 1 bajo vacío y se procedió a determinar el contenido de proteína soluble, para el cálculo del rendimiento de proteína extraída (%).

3.5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE

Una vez obtenidos los parámetros óptimos de temperatura, tiempo, relación CPCG:solvente por el método de superficie respuesta la solución proteica se precipitó a pH 4.5 con HCl 1M y luego fue centrifugada a 4000 g por 12 min a 8 °C. El precipitado resultante se lavó dos veces y luego se resuspendió con agua a un pH ajustado a 7.0 con

NaOH 1N, luego de esto la solución obtenida fue liofilizada. La proteína soluble liofilizada obtenida fue caracterizada en proteína total, rendimiento de extracción de la proteína soluble, NNP y por electroforesis SDS-PAGE y electroforesis bidimensional (2D).

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó considerando tres etapas para el estudio. La primera etapa consistió en realizar un “*screening o cribado*” de las principales variables independientes o factores que pudieran afectar significativamente a la extracción de la proteína del calamar gigante, en la segunda etapa, se realizó el procedimiento de escalamiento ajustando los rangos de las variables que resultaron significativas de la etapa anterior, en la tercera se realizó la optimización de las condiciones de extracción, considerando las variables seleccionadas de la etapa del *screening* por último se calculó la función deseabilidad y se validó el modelo. Las etapas se describen a continuación:

3.6.1. SCREENING O CRIBADO: DISEÑO DE PRIMER ORDEN

Cuatro diferentes variables independientes o factores fueron evaluadas durante la selección de las variables significantes involucradas en la extracción de la proteína del calamar gigante. Estas variables fueron: concentración de NaCl (X_1), tiempo (X_2), temperatura (X_3), y relación CPCG:solvente (X_4), se tomó como parámetro constante el pH= 10 de acuerdo a pruebas experimentales previamente realizadas y se realizaron 3 repeticiones por cada muestra. El efecto independiente de cada una de las variables citadas y el de sus interacciones, se evaluaron utilizando un diseño factorial 2^k con tres puntos centrales, donde se evaluó el efecto significativo sobre el rendimiento de extracción de la proteína ($p < 0.05$). Las variables se codificaron y se establecieron los diferentes niveles de acuerdo a datos de la literatura basados en la extracción de proteínas y pruebas preliminares realizados; lo que se presenta en la Tabla 7.

Para lograr el objetivo del *screening* se realizó un diseño factorial 2^k utilizando 3 puntos centrales. La función de respuesta investigada (variable dependiente) corresponderá al rendimiento de la extracción de proteína soluble extraída. El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Inc., VA, USA) y Minitab (2017).

TABLA 7. Factores experimentales y niveles evaluados en el diseño factorial 2^K para la extracción de la proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante

Variables Independientes	Codificado	Niveles		
		-1	0	1
Concentración de NaCl (M)	X ₁	0	1	2
Tiempo (min)	X ₂	10	35	60
Temperatura (°C)	X ₃	20	42.5	65
Relación CPCG:solvente (g/ml)	X ₄	1:10	1:30	1:50

3.6.2. ESCALAMIENTO

Los resultados obtenidos del *screening* permitieron determinar las variables que influyen directamente en el proceso estudiado, seguidamente se realizó el escalamiento para caracterizar mejor la superficie y modelar la curvatura. Una vez que se tuvo el modelo ajustado se determinaron las condiciones óptimas de operación del proceso (Gutiérrez y Vara, 2008).

3.6.3. OPTIMIZACIÓN: DISEÑO DE SEGUNDO ORDEN

Los factores identificados de la etapa anterior como significativos se optimizaron por MSR y se calculó la función deseabilidad. El análisis de respuesta de segundo orden para la concentración de proteína soluble; se realizó a través de un Diseño Central Compuesto (Tabla 8) para determinar la influencia de las variables independientes seleccionadas de la etapa del *screening* y las condiciones óptimas para la extracción de la proteína soluble del CPCG se calculó utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Inc., VA, USA).

Las corridas experimentales fueron totalmente randomizadas para minimizar los efectos de la variabilidad no esperada en las respuestas observadas. El modelo propuesto para la variable respuesta rendimiento de extracción de proteína soluble corresponderá a:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i z_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} z_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^4 \beta_{ij} z_i z_j \dots\dots\dots(3)$$

TABLA 8. Factores experimentales y niveles evaluados en el proceso de optimización por Diseño Central Compuesto para la extracción de la proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante

Variables Independientes	Codificado	Niveles				
		-1.41	-1	0	1	1.41
Temperatura (°C)	X ₃	31.72	40	60	80	88.28
Relación CPCG:solvente (g/ml)	X ₄	1:31.72	1:40	1:60	1:80	1:88.28

La respuesta generada para obtener el máximo rendimiento de proteína extraída, fue experimentalmente validada con tres repeticiones experimentales. Se graficaron las superficies variando dos variables dentro del rango experimental evaluado y manteniendo las otras constantes al punto central (cero 0).

3.6.4. FUNCIÓN DESEABILIDAD

La función deseabilidad se compone de dos partes la deseabilidad individual (d_i) y la deseabilidad compuesta (D) y va a depender de si el objetivo de la investigación es maximizar o minimizar la respuesta, o limitar el rango de sus valores. La primera evalúa las diferentes configuraciones y las codifica en función de cual optimiza la respuesta, por lo que se busca transformar cada y_i en un d_i que se va a encontrar dentro del rango de $0 \leq d_i \leq 1$ (Myers *et al.*, 2016).

Para un

$$d_i = 0 \text{ Si } y_i \text{ está fuera de la región aceptable}$$

$$d_i = 1 \text{ Si } y_i \text{ está en su objetivo}$$

La segunda determina la forma en que la estructura optimiza un conjunto de respuestas específicas, por lo que (D) toma un valor entre 0 y 1, donde 1 representa la situación óptima y 0 le corresponde que una o más respuestas no se encuentran dentro del rango aceptable (Myers *et al.*, 2016). Para su determinación se utilizó el programa estadístico Minitab (2017).

3.6.5. VALIDACIÓN DEL MODELO

Para validar el modelo se realizaron tres repeticiones experimentales con los parámetros óptimos obtenidos por el programa para comparar los rendimientos de extracción de proteína soluble con los valores obtenidos por el modelo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS DEL CALAMAR GIGANTE

Para realizar la presente investigación se adquirieron en total una cantidad de 5 muestras de calamar gigante, las cuales se mantuvieron a temperaturas por debajo de 4 °C bajo hielo, con peso y longitud de manto promedio de 20 kg y 40 cm. Para medir el grado de frescura se utilizó el método del índice de calidad (MIC) para calamar gigante propuesto por Ordoñez y Plácido (2004) (Tabla 9); de acuerdo a dicho método la calidad de la materia prima se mide por puntos de deméritos siendo 0 puntos para especímenes muy frescos, 10 puntos para el límite de frescura y 14 puntos se considera un estadio de pérdida total de frescura.

Al cabo de efectuar la evaluación sensorial de las muestras por el MIC, el resultado obtenido correspondió a una materia prima de alto grado de frescura con un valor de 1 punto de demérito (Tabla 9), se pudo observar que el atributo que sufrió una ligera disminución de frescura fueron los ojos el cual fue común para todas las muestras evaluadas; al respecto Ordoñez y Plácido (2004), observaron en su investigación que, la calidad de los ojos empezaron a disminuir a partir del tercer día de almacenamiento, por lo que se podría inferir que las muestras adquiridas podrían tener al menos 3 días de almacenamiento previo a la investigación.

Por otro lado, se realizó la medición de pH del músculo de calamar gigante fresco obteniendo un valor de 6.0, al respecto Ordoñez y Plácido (2004) en su investigación reportaron un valor de pH de 5.8 para ejemplares de calamar gigante almacenados con hielo a temperaturas de 0 °C, mientras que Bravo (2001) reportó un valor de 6.17 para muestras recién capturadas y almacenadas en hielo. Maza *et al.* (2007) obtuvieron un pH entre 6.05 y 6.45, al respecto mencionaron que, este factor no presenta relación alguna con la longitud y peso del manto del calamar gigante, pero si representa información sobre el índice de calidad, lo que corrobora lo encontrado por Hebard *et al.* (1982) donde

TABLA 9. Resultados de evaluación de la calidad de acuerdo al método del índice de calidad (MIC)

PARÁMETROS	ATRIBUTOS	PUNTAJE	MUESTRA					
			1	2	3	4	5	
APARIENCIA	Superficie	Superficie muy rojo oscuro en el dorso, y más clara en la parte ventral	0	X	X	X	X	X
	dorsal y ventral	Superficie aún brillante, dorso gris claro y vientre blanquecido	1	-	-	-	-	-
		Superficie sin brillo, dorso y parte ventral de color rojo pardo	2	-	-	-	-	-
		Superficie opaca, dorso y parte ventral morados	3	-	-	-	-	-
	Ojos	Convexos, claros, traslúcidos	0	-	-	-	-	-
		Ligeramente opacos, algo planos	1	X	X	X	X	X
TEXTURA		Opacos, hundidos	2					
		Elástico, flexible	0	X	X	X	X	X
	Músculo (del manto)	Ligeramente blando, resiste la presión dactilar, sin dejar huellas	1	-	-	-	-	-
		Muy blando, huellas a la presión dactilar.	2	-	-	-	-	-
		Flexibles, turgentes, ventosas con anillos con capacidad de succión	0	X	X	X	X	X
	Tentáculos	Algo flácidos, desprendimeto de anillos de las ventosas poca succión	1	-	-	-	-	-
OLOR		Flácidos, ventosas sin anillos, total pérdida de succión	2	-	-	-	-	-
	Superficie del manto (abierto)	Fresco a mar, a algas	0	X	X	X	X	X
		Neutro a ligero ácido	1	-	-	-	-	-
		Ácido a ligeramente abombado	2	-	-	-	-	-
		Amoniacaal, a pútrido	3	-	-	-	-	-
COLOR	Músculo (sin piel)	Blanco, traslúcido, brillante	0	X	X	X	X	X
		Opaco amarillento	1	-	-	-	-	-
		Pigmentado de rosado a morado	2	-	-	-	-	-
TOTAL		14	1	1	1	1	1	

demonstraron que el pH tiende a elevarse hasta 7.0 por efecto del aumento del amoniacó a consecuencia del proceso de putrefacción. Asimismo, Ordoñez (1994), reportó un valor de pH de 5.5 para músculo de calamar gigante muy fresca, además indica que mientras va aumentando el pH, éste va perdiendo su frescura llegando a estar deteriorado a un pH igual a 7.0, ello producto probablemente de la acción de las bacterias sobre los aminoácidos y el óxido de trimetilamina. Cabe señalar que para el trabajo de investigación sólo se utilizó el manto del calamar gigante.

4.2. CONCENTRADO PROTEICO DE CALAMAR GIGANTE

Tras el procesamiento del manto de calamar gigante siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5.1, se obtuvo el concentrado proteico de calamar gigante (CPCG) en polvo cuyas características sensoriales fueron evaluadas de acuerdo a la tabla propuesta por Lazo (2006) (Anexo 2), los resultados del producto determinaron una coloración blanco lechoso, con ligero olor y sabor a calamar gigante; y una textura suave al tacto y pulverulenta, el resultado fue de una puntuación de 10 el cual cataloga al concentrado elaborado como un producto de calidad buena (Tabla 10).

TABLA 10. Resultados de la evaluación sensorial al CPCG

	Características	Evaluación
Color	Blanco Lechoso	3
	Blanco cremoso	-
	Amarillo opaco	-
Olor	Sin olor a pota	-
	Ligero olor a pota	2
	Con olor a pota	-
Sabor	Sin sabor a pota	-
	Ligero sabor a pota	2
	Con sabor a pota	-
Textura	Suave al tacto y pulverulenta	3
	Áspero y pulverulenta	-
	Duro y granuloso	-
Total		10

El rendimiento obtenido después de la elaboración del CPCG en polvo fue de 10% concordando con lo reportado por Lazo (2006) quién logró obtener un valor de rendimiento del 10.6%, mientras que, Calvo *et al.* (2016), reportaron un rendimiento entre

20 y 25% para harina de calamar gigante, la diferencia entre los valores reportados radica en que el primero utilizó exclusivamente manto, mientras que el segundo utilizó además aletas, cabeza, y vísceras.

La Tabla 11 muestra la comparación entre las composiciones proximales de diferentes concentrados y harinas elaboradas a partir de calamar gigante, con respecto al análisis realizado en la presente investigación, el concentrado proteico en polvo presentó un contenido proteico de humedad y lípidos de 88.05, 7.51 y 1.26% respectivamente, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Lazo (2006) en su harina de pota (HP), donde reporta que la humedad, la grasas y la proteína total fueron de 6.30, 2.70 y 86.04% respectivamente.

Solari-Godiño *et al.* (2017) obtuvieron un surimi de calamar gigante liofilizado con un contenido de proteína inferior a lo reportado en esta investigación, como se sabe el surimi es un producto elaborado en base a lavados para eliminar el sabor, olor, color y concentrar proteína. Calvo *et al.* (2016) elaboraron una harina a partir de calamar gigante entero (incluye vísceras, pico y pluma), la razón por la cual las diferencias entre los contenidos de proteína, grasa y ceniza difieren de la presente investigación radica en la diferencia de humedades que presentan las partes del cuerpo como aleta, tentáculos. Asimismo, Yenque (2016) elaboró un concentrado proteico de pota reportando un contenido de proteína de 93.08% y humedad de 3.24%, al respecto se puede decir que estos valores tan elevados se pueden atribuir a que el contenido de humedad en el producto es muy bajo razón por la cual se eleva el contenido de proteínas.

4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO NO PROTEICO DEL CPCG

El nitrógeno no proteico (NNP) de acuerdo a Nakaya, (1998); Sánchez, (2002) y Maza *et al.* (2003), es definido como la fracción hidrosoluble de compuestos constituidos principalmente por cloruro de amonio (NH₄Cl), bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT), trimetilamina (N-TMA), aminoácidos libres, péptidos, los cuales producen en el calamar gigante un sabor ácido amargo, lo que limita su consumo directo y la comercialización de este recurso (Carrizoza, 2000 y Yamanaka *et al.*, 1995).

TABLA 11. Composición proximal de diferentes concentrados a partir de calamar gigante

Análisis	CPCG	CPCG¹ Roldán Lazo (2009)	SLCG² y Solari-Godiño (2017)	HCG³ Calvo <i>et al.</i> (2016)	CPP⁴ Yenque (2016)
Humedad (%)	7.51	6.30	4.9	3.6	3.24
Proteína (%)	88.05	86.04	58.7	77.76	93.08
Grasa (%)	1.26	2.70	1.5	6.33	0.64
Ceniza (%)	1.63	4.96	4.4	8.54	0.69

CPCG¹: concentrado proteico en polvo de calamar gigante

SLCG²: surimi liofilizado de calamar gigante

HCG³: harina de calamar gigante

CPP⁴: concentrado proteico de pota

Los resultados obtenidos, luego de realizar el análisis de NNP en el músculo de calamar gigante fresco y al CPCG en polvo fueron de 8.2 y 1.14 mg de NNP/g de muestra respectivamente, esto concuerda con lo reportado por Maza *et al.*, (2003) y Pedreschi (1993) quienes encontraron valores de NNP en calamar gigante fresco de 7.3 y 8.5 mg de NNP/g. Por otro lado, la baja concentración de NNP determinada en el CPCG demuestra que, estos compuestos pueden ser reducidos durante los procesos de lavado y cocción; al respecto Lazo (2006), menciona que la reducción de los compuestos NNP disminuyen por efecto de los lavados continuos ya que éstos contribuyen al sabor ácido-amargo y el olor característico de la materia prima. Maza *et al.* (2003), consiguieron eliminar el sabor ácido amargo producto de los NNP por un proceso de lixiviación (ácido-alcalino); Charley (1991), menciona que durante el proceso de cocción la carne pierde sales solubles, agua y compuestos que le dan sabor al recurso marino y al mismo tiempo daña el tejido conjuntivo el cual se solubiliza y permite que se pueda realizar la extracción de compuestos hidrosolubles como: cloruro de amonio, bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT), pero además el efecto de la cocción permite la desnaturalización de la proteína miofibrilar volviéndola insoluble y logrando así la liberación y reducción de proteína sarcoplasmática (Benavides y Villalobos, 2003). Albretch (s.f) menciona que el calamar gigante de manera natural presenta grandes concentraciones de cloruro de amonio y que al entrar en contacto con el agua estos compuestos se disuelven hasta llegar a un equilibrio debido a que por efecto de la alcalinidad o valores superiores a 7.0 de pH el cloruro de amonio NH₄Cl se disocia en los líquidos.

4.4. EXTRACCIÓN ALCALINA DE LA PROTEÍNA SOLUBLE DEL CALAMAR GIGANTE

4.4.1. SCREENING DE VARIABLES

Para lograr la extracción de la proteína soluble a partir del concentrado proteico en polvo de calamar gigante se utilizó el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2, para esto se aplicó un diseño factorial 2^k con 3 puntos centrales constando de 19 tratamientos (Tabla 12).

En la Tabla 12 se reportan los resultados obtenidos luego de realizada la extracción de la proteína soluble, así se obtuvo como resultados experimentales del rendimiento de extracción valores en el rango entre 1.25 y 11.41%. En la misma tabla, se aprecia que estos valores varían de acuerdo a las condiciones establecidas; así se puede observar que los tratamientos que presentaron menor rendimiento de extracción de proteína soluble se dieron en las muestras que se sometieron a altas concentraciones de NaCl (2M), mientras que los mayores valores se dieron en ausencia de sales. Por otro lado, se puede notar que existe una influencia marcada cuando se da la combinación de factores como la temperatura y la concentración de NaCl sobre el rendimiento ya que a mayor temperatura (65 °C) y sin la presencia de sal (sólo agua) se obtuvo el valor más alto (~11%). Observando los valores de los puntos centrales, se puede apreciar una mínima diferencia entre ellos, esto permite indicar que los resultados fueron conducidos de forma adecuada reduciendo así las interferencias generadas por los errores experimentales.

De la Tabla 12, se tuvo que el mayor rendimiento de extracción se da considerando la extracción sin NaCl, tiempo y temperatura de 60 minutos y 65 °C, respectivamente y una relación CPCG:solvente de 1:50. Para discriminar la o las variables determinantes en el proceso se realizó el análisis de variancia, cuyos resultados se presentan en la Tabla 13, en ella se muestran los efectos principales y los efectos de la interacción de los parámetros estudiados (variables independientes). Los parámetros e interacciones que presentan p -valor < 0.05 son considerados estadísticamente significativos. Se puede decir también que, el valor de curvatura obtenida (0.7710) no fue significativo lo que conlleva a decir que el modelo lineal no es apropiado para este caso y necesita explicarse por medio

TABLA 12. Diseño arreglo factorial 2^K con repeticiones en el centro, variables codificadas (-1, 0 1), respuestas experimentales y estimadas del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG

N°	Concentración NaCl (M)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Relación CPCG:Solvente (mg/mL)	Proteína (mg/100 gr)	Rendimiento (%)	
	X1	X2	X3	X4		Experimental	Estimado
						\hat{Y}	\hat{Y}
1	1 (0)	35 (0)	42.5 (0)	1:30 (0)	4.917	5.58	4.29
2	0 (-1)	10 (-1)	20 (-1)	1:10 (-1)	1.602	1.82	1.96
3	2 (1)	60 (1)	20 (-1)	1:10 (-1)	1.813	2.06	1.68
4	2 (1)	10 (-1)	65 (1)	1:10 (-1)	2.009	2.28	3.11
5	0 (-1)	10 (-1)	20 (-1)	1:50 (1)	2.967	3.37	3.66
6	2 (1)	60 (1)	65 (1)	1:50 (1)	4.715	5.35	6.20
7	0 (-1)	60 (1)	65 (1)	1:10 (-1)	2.686	3.05	4.38
8	2 (1)	10 (-1)	20 (-1)	1:50 (1)	2.623	2.98	2.64
9	0 (-1)	10 (-1)	65 (1)	1:10 (-1)	5.184	5.89	5.00
10	0 (-1)	60 (1)	65 (1)	1:50 (1)	10.050	11.41	10.52
11	1 (0)	35 (0)	42.5 (0)	1:30 (0)	4.419	5.02	4.29
12	0 (-1)	60 (1)	20 (-1)	1:10 (-1)	1.098	1.25	1.58
13	2 (1)	60 (1)	65 (1)	1:10 (-1)	1.934	2.20	1.84
14	2 (1)	10 (-1)	65 (1)	1:50 (1)	3.976	4.52	4.12
15	2 (1)	60 (1)	20 (-1)	1:50 (1)	3.632	4.12	4.94
16	0 (-1)	60 (1)	20 (-1)	1:50 (1)	5.698	6.47	6.62
17	0 (-1)	10 (-1)	65 (1)	1:50 (1)	5.654	6.42	7.78
18	2 (1)	10 (-1)	20 (1)	1:10 (-1)	1.665	1.89	2.71
19	1 (0)	35 (0)	42.5 (0)	1:30 (0)	5.242	5.95	4.29

de una ecuación de regresión ajustada. Así, se obtuvo el modelo de la ecuación de regresión, el cual se presenta a continuación:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento (\%)} = & 0.536089 + 1.24859*X_1 - 0.0224071*X_2 + 0.0624947*X_3 + \\ & 0.0135179*X_4 - 0.0065025*X_1*X_2 - 0.0293361*X_1*X_3 - 0.0221844*X_1*X_4 - \\ & 0.000104333*X_2*X_3 + 0.00167488*X_2*X_4 + \\ & 0.000605417*X_3*X_4 \dots\dots\dots(4) \end{aligned}$$

De acuerdo a la ecuación de regresión generada arriba se pudieron calcular los valores estimados de rendimiento de extracción de proteína soluble por cada tratamiento el cual se presenta en la Tabla 12, los que permitieron comparar los valores teóricos con los prácticos obtenidos en el laboratorio, así se determinó que los resultados experimentales obtenidos se encuentran muy cercanos a los valores estimados, por lo que se puede decir, que el procedimiento se llevó de manera correcta, esto confirma el valor de la correlación $R^2 = 87.27\%$ (Tabla 13).

TABLA 13. Análisis de variancia Diseño Factorial 2^k

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
X₁:Concentración NaCl	12.711	1	12.711	7.44	0.0259
X ₂ :Tiempo	2.85695	1	2.85695	1.67	0.2319
X₃:Temperatura	18.4062	1	18.4062	10.78	0.0111
X₄:Relación	36.66	1	36.66	21.47	0.0017
CPCG:solvente					
X ₁ X ₂	0.422825	1	0.422825	0.25	0.6321
X ₁ X ₃	6.97092	1	6.97092	4.08	0.0780
X ₁ X ₄	3.14974	1	3.14974	1.84	0.2114
X ₂ X ₃	0.0551076	1	0.0551076	0.03	0.8619
X₂X₄	11.2208	1	11.2208	6.57	0.0335
X ₃ X ₄	1.18756	1	1.18756	0.70	0.4285
Error total	13.6587	8	1.70734		
Total (corr.)	107.3	18			
Curvatura					0.7710
R ²					0.8727

En la Figura 7 se presenta el diagrama de Pareto, en ella se muestra claramente, cuales son los parámetros que presentan mayor efecto sobre la variable respuesta denominada rendimiento de extracción de proteína soluble. A partir de este diagrama fue posible

determinar la magnitud de los efectos de los parámetros representados por medio de las columnas. Las longitudes de las barras del Diagrama de Pareto (Figura 7) son proporcionales a los impactos sobre la variable respuesta: rendimiento de extracción de la proteína, esto quiere decir; que, toda barra que se extienda más allá de la línea transversal azul describe un efecto significativo relacionado al intervalo de confianza (5%), efecto que puede ser positivo (+) o negativo (-). De la Figura 7, se observa las variables que presentaron un efecto significativo positivo sobre el rendimiento de extracción de proteína soluble: la relación CPCG:solvente (D), concentración de NaCl (A), y la temperatura (C); mientras que la variable concentración de NaCl resultó en un efecto negativo sobre la respuesta.

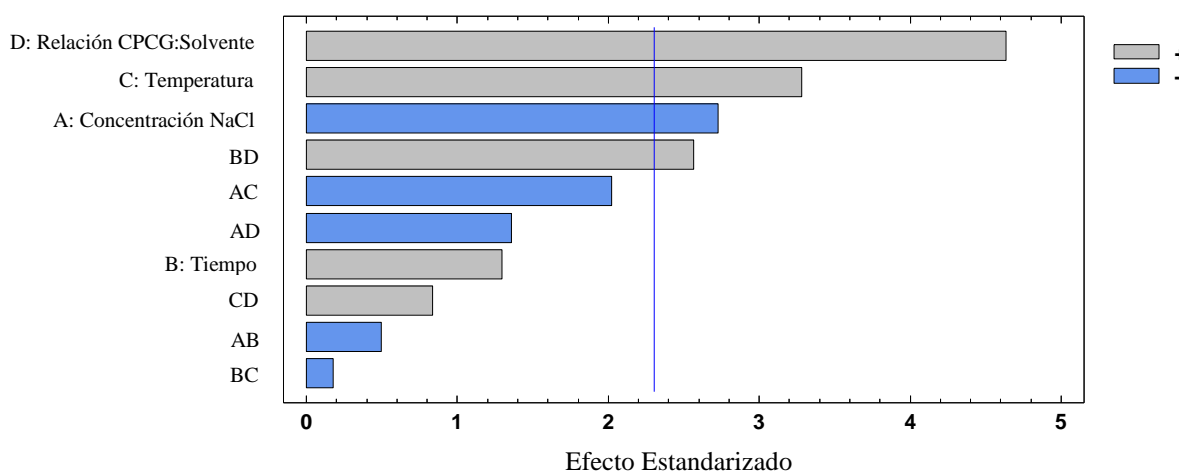


FIGURA 7. Diagrama de Pareto del rendimiento de extracción de proteína soluble del concentrado proteico de calamar gigante.

De otro lado las interacciones de los parámetros más importantes o que ejercieron una mayor influencia en las respuestas fueron BD; relación CPCG:solvente y tiempo y AC; concentración NaCl y temperatura.

Con respecto al efecto negativo de la sal sobre la respuesta evaluada Fennema y Tannenbaum (1993) mencionan que a fuerza iónica baja (< 0.5 M), los iones neutralizan las cargas de la superficie de las proteínas, produciendo dos modos de solubilidad, según las características de la superficie de la proteína, por ejemplo, en las que tienen abundantes zonas apolares, la solubilidad desciende, en cambio, aumenta en aquellas otras en las que las zonas apolares son escasas, además el descenso de la solubilidad se da entre otras cosas por efecto del incremento de las interacciones hidrofóbicas.

Badui (1982) menciona que las sales neutras permiten la solubilización de las proteínas miofibrilares, y esto está muy relacionado con la fuerza iónica que desarrollan, la cual depende tanto de la concentración, como del número de cargas eléctricas provenientes de los cationes y aniones aportados por la sal. Dentro de un cierto intervalo de bajas concentraciones, las sales incrementan la solubilidad, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado (Badui 1982), además la sal tiene doble efecto sobre la carne: solubilizar la proteína miofibrilar y extraerla (Cheng *et al.* 1979).

La Figura 8, muestra el gráfico de los efectos principales de variables estudiadas y nos proporciona una idea independiente y cualitativa de cada variable estudiada y su efecto sobre la respuesta (rendimiento de extracción de proteína soluble), con respecto a la concentración de NaCl esta describe también un efecto negativo o indirecto, de acuerdo a Lestari *et al.* (2010), las sales aumentan la fuerza iónica de la solución y, como resultado, la solubilidad de las proteínas aumenta, por otro lado, Makkar *et al.* (2008) mencionan que NaCl afecta negativamente a la solubilidad de la proteína mediante el aumento de la fuerza iónica en soluciones, resultando en una mayor interacción hidrófoba entre las moléculas de proteína y la disminución de la solubilidad de proteínas, asimismo, Nelson y Cox (2001) explicaron que las sales de iones divalentes tales como el $MgCl_2$ y el $(NH_4)_2SO_4$, son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl, KCl y NH_4Cl .

La influencia del tiempo se hace positiva pero no ejerce mayor influencia sobre la variable respuesta, mientras que, la temperatura a diferencia de la concentración de NaCl presenta un efecto directo sobre la respuesta, aumentando el rendimiento de la extracción de la proteína a medida que el parámetro incrementa su valor. Si bien es cierto que usualmente la pérdida de solubilidad en proteínas calentadas es atribuible a un proceso de desnaturalización, los cambios en la solubilidad son el resultado del doble efecto de desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas (desnaturalización) y de la agregación de las proteínas; la importancia relativa de uno u otro mecanismo depende de cada sistema en particular y de las condiciones de calentamiento (Fennema, 2008).

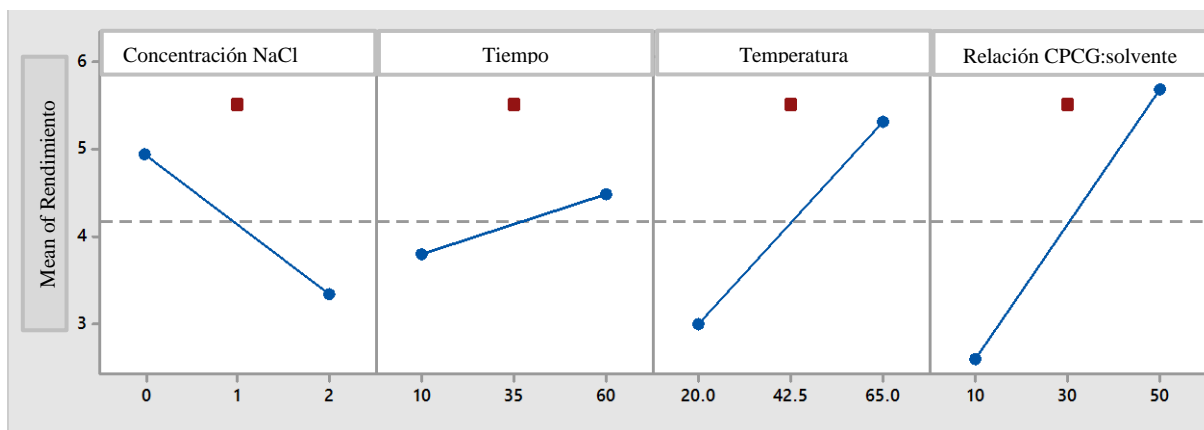


FIGURA 8. Gráfico de efectos principales de las variables independientes concentración de NaCl, tiempo, temperatura y relación CPCG:solvente

Asimismo, estos resultados permitieron demostrar que el efecto de la temperatura presentó un efecto positivo durante la extracción, esto pudo deberse a la combinación conjunta de factores tales como el pH y la temperatura, dado que juegan un rol importante sobre la solubilidad de proteínas. Se sabe además que las proteínas sarcoplasmáticas tiene un efecto sobre la humedad de la matriz proteica y que por efecto de la temperatura sobre los 90 °C ésta tiende a liberarse (Elizondo *et al.* 2016); esto va a depender de la especie y de las propiedades de sus proteínas (Gehring *et al.*, 2010).

Por otro lado, Paul *et al.* (1966), encontraron que las proteínas sarcoplasmáticas están compuestas por NNP y nitrógeno proteico, y que éstas por efecto del tratamiento térmico incrementaron en su contenido de nitrógeno soluble, el mismo resultado se tuvo en la proteína miofibrilar, esto concuerda con los resultados mostrados en la Figura 8, ello podría estar basado en los cambios en la solubilidad por la presencia de enzimas proteolíticas naturales presentes en el tejido muscular y que además éstas podrían ser resistentes al efecto del calentamiento y podrían generar cierta desnaturalización de las proteínas permitiendo su solubilización.

Liu *et al.* (2012), encontraron que, las proteínas miofibrilares aumentaban su solubilidad con el incremento de la temperatura por encima de los 65 °C, esto pudo ser causado por la ruptura de los enlaces hidrógeno y la fuerza electrostática la que causó la expansión de las proteínas miofibrilares y por ende aumentó la solubilidad de la proteína miofibrilar; Wattanachant *et al.* (2005) evaluaron el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura

y propiedad de las proteínas cárnicas reportando elevados contenidos de proteína soluble en muestras calentadas a 80, 90 y 100 °C respectivamente, sugiriendo que este comportamiento sería resultado de la ruptura de enlaces hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro. Ito *et al.* (2004), encontraron que, el 90 % de las proteínas miofibrilares solubles en agua permanecieron solubles y con una baja viscosidad después de haber sido sometidas a tratamiento térmico a temperaturas superiores a 60 °C, éste fenómeno podría explicarse que a través del calentamiento a altas temperaturas ésta induce al desplegamiento, resolubilización y estabilización de las proteínas miofibrilares solubles en agua, a pesar de que es ampliamente aceptado que el calentamiento produce la desnaturalización y por ende la solubilidad de proteínas descienda (Cheftel *et al.*, 1985), lo que indica que la solubilidad de la proteína estaría muy relacionada con la estructura de la proteína, interacciones intra e intermoleculares y su configuración espacial.

En la Figura 8, la relación CPCG:solvente presenta un efecto positivo sobre el valor de rendimiento de extracción de la proteína soluble, al respecto, Hultin y Kelleher (2001) mencionan que, generalmente se usa la relación de materia prima:solvente mayor a 1:7 y de preferencia mayor a 1:9, ya que el objetivo es obtener un líquido de baja viscosidad junto con la muestra, debido a que una viscosidad baja dificulta la extracción del compuesto en estudio. Así mismo, Ingadottir (2004) indica que, la viscosidad de una solución de proteínas se ve afectada por factores como la concentración de proteínas, el pH, la sal y la materia prima, que a su vez pueden afectar el tamaño, la forma, la flexibilidad y la hidratación de las proteínas.

4.4.2. ESCALAMIENTO

La necesidad de profundizar en el análisis en esta etapa se dio porque los resultados obtenidos no fueron concluyentes a pesar de que el valor de curvatura fue no significativo como se apreció en el análisis de variancia en la etapa de *screening* o cribado presentado en la Tabla 12, por lo que se necesitó realizar el proceso de escalamiento de las variables temperatura (X_3) y relación CPCG:solvente (X_4), así el rango de escalamiento para poder modelar la curvatura de la superficie en ambas variables fue de 40 a 80 °C y de 1:40 a 1:80 g/mL.

Cabe indicar que habiendo resultado una significancia negativa la variable independiente concentración de NaCl, no se tomó en cuenta ésta variable dado que los mejores resultados se lograron cuando no se utilizó sal en la solución extractante. Los parámetros encontrados de temperatura, tiempo y relación CPCG:solvente en el *screening* son un indicador de que el máximo rendimiento se encuentra cerca de la región óptima.

4.4.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO

Para lograr la optimización del proceso se utilizó un diseño central compuesto (DCC) de segundo orden, según lo descrito por Ayala y Pardo (1995). Para ello se utilizaron las variables significativas provenientes del proceso de *screening* y modificadas de acuerdo a lo propuesto en el proceso de escalamiento siendo éstas, temperatura: 40-80 °C y relación CPCG:solvente: 1:40 – 1:80, empleando como solvente agua MilliQ, el tiempo se mantuvo en 35 minutos y el pH a 10. El criterio para la optimización fue el rendimiento de extracción de proteína soluble.

La Tabla 14 nos muestra que el rendimiento de extracción encontrado de la combinación de variables presentó valores en el rango entre 2.56 y 13.10 %, además permitió determinar que la mejor combinación de variables fue la temperatura de 80 °C y la relación CPCG:solvente de 1:40 obteniendo el máximo rendimiento de extracción 13.10 %.

Los valores promedios de rendimiento de extracción de proteína soluble de CPCG experimentales y los valores estimados se muestran en la Tabla 14. Los valores obtenidos tanto los experimentales como los estimados de acuerdo a ecuación de segundo orden indican que existió un adecuado procedimiento de extracción.

Por otro lado, el modelo matemático de segundo orden obtenido indica la relación entre la variable respuesta rendimiento de extracción de proteínas solubles del CPCG y las variables independientes, dicha ecuación se muestra a continuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = -4.79715 + 0.471408 * X_3 - 0.0478097 * X_4 - 0.00300781 * X_3^2 + 0.00030625 * X_3 * X_4 - 0.000332811 * X_4^2 \dots \dots \dots (5)$$

TABLA 14. Diseño central compuesto con repeticiones en el centro, variables codificadas, respuestas experimentales y estimadas del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG

N°	Temperatura (°C)	Relación CPCG:Solvente (g/mL)	Rendimiento (%)	
	X3	X4	Experimental Ŷ	Estimado Ŷ
1	60 (0)	1:60 (0)	9.82	9.70
2	60 (0)	1:31.71 (-1.41)	10.10	11.39
3	88.28 (1.41)	1:60 (0)	11.19	10.93
4	31.71 (-1.41)	1:60 (0)	4.20	3.64
5	60 (0)	1:60 (0)	9.57	9.70
6	80 (1)	1:80 (1)	8.17	9.67
7	40 (-1)	1:80 (1)	2.56	2.56
8	80 (1)	1:40 (-1)	13.10	12.20
9	60 (0)	1:88.28 (1.41)	9.57	7.47
10	40 (-1)	1:40 (-1)	7.98	7.29

El modelo cuadrático proveniente del diseño rotatable y compuestos se analizaron por medio de un análisis de variancia el cual se muestra en la Tabla 15. El resultado del análisis de variancia (ANVA) obtenido luego de someterlo al estudio estadístico, determinó que existe una alta significancia ($p < 0.05$) correspondiente a la variable temperatura identificando que fue el parámetro de mayor influencia en la extracción de proteína soluble de CPCG, mientras que la relación CPCG:solvente no fue significativo sobre la variable respuesta.

TABLA 15. ANVA Diseño Central Compuesto para la optimización de la extracción de proteína soluble del CPCG

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
X ₃ :Temperatura	39.9114	1	39.9114	15.34	0.0173
X ₄ :Relación CPCG:solvente	11.7124	1	11.7124	4.50	0.1011
X ₃ X ₃	4.42968	1	4.42968	1.70	0.2620
X ₃ X ₄	0.0441	1	0.0441	0.02	0.9027
X ₄ X ₄	0.0522156	1	0.0522156	0.02	0.8942
Error total	10.4074	4	2.60186		
Total (corr.)	67.0606	9			
R ²					0.8543

Con respecto al valor del coeficiente de correlación (R²) de 85.43% (Tabla 15) se puede decir que, la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático y que por lo tanto existe una relación estrecha entre los valores experimentales y los valores estimados. Para confirmar los resultados se presenta la Figura 9 con la correlación de los valores.

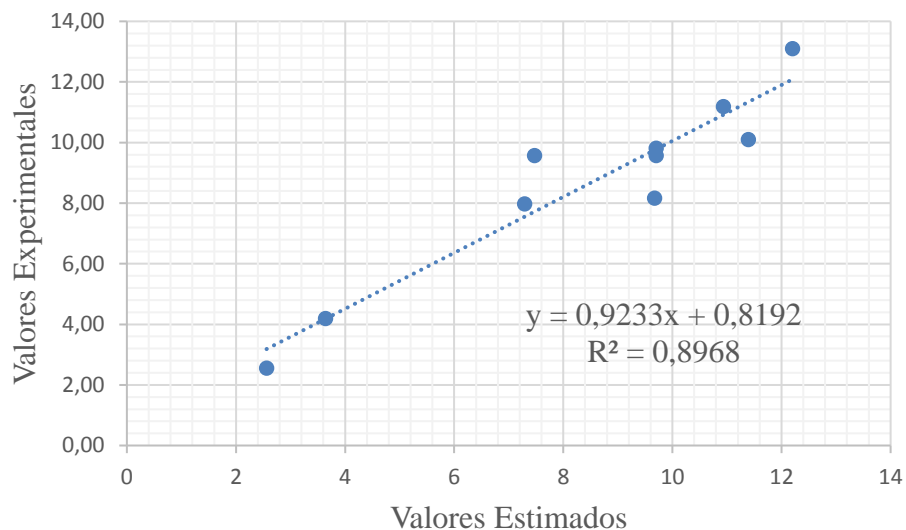


FIGURA 9. Comparación del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG experimental y estimado por el modelo cuadrático

En la Figura 10 se muestra la relación de los efectos de las variables experimentales sobre la respuesta en ella se demostró que la relación CPCG:solvente prima tiene un efecto directo sobre la disminución de la concentración de proteína, mientras que la temperatura mostró un efecto positivo hasta los 70 °C aproximadamente, luego de ello, presenta un efecto negativo sobre la concentración.

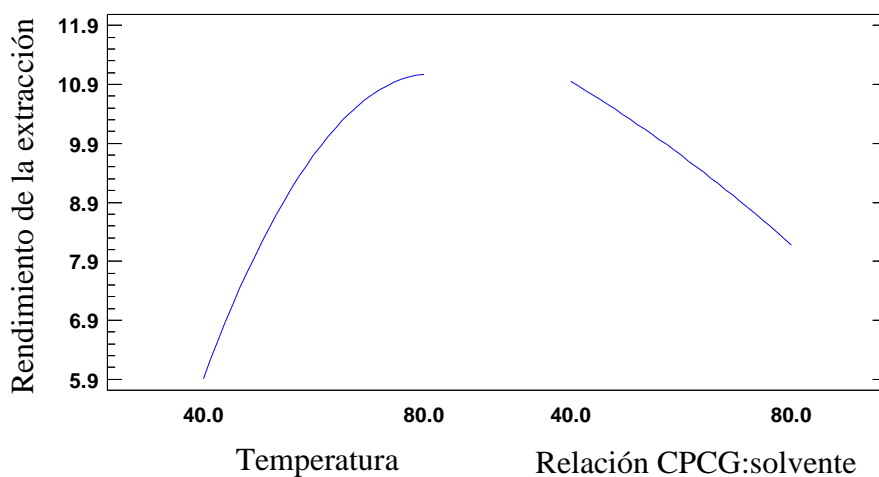


FIGURA 10. Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización

4.4.4. ANÁLISIS DE LA SUPERFICIE RESPUESTA

En la Figura 11 se presenta la superficie respuesta obtenida después de realizar la optimización del proceso de extracción de proteína, en ella se confirma que efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la extracción de proteína es positivo hasta aproximadamente los 70 °C punto en el cual los valores de la respuesta empiezan a descender, del mismo modo el efecto de la relación CPCG:solvente se hace negativo al aumentar el volumen de extractante siendo el idóneo la relación aproximada de 1:40, al respecto Oomah *et al.* (1994) mencionan que el rendimiento de proteína aumenta con la disminución de la relación materia prima:solvente de otro lado, Nilo-Rivas *et al.* (1981) demostraron que un gran exceso de solvente disminuye el rendimiento de proteína. Por su parte, Ventura *et al.* (2005), mencionan que la cantidad de harina a solubilizar en el sistema, influye significativamente en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada, sin embargo, el solvente debe ser adecuado para que no se sature los componentes solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada entre la cantidad de solvente y la cantidad de proteínas a solubilizar.

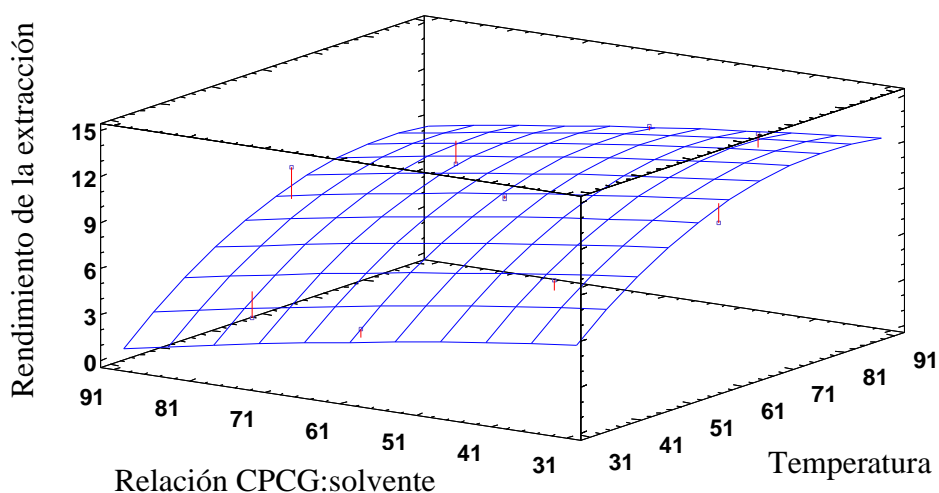


FIGURA 11. Superficie respuesta del rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG en función a Relación CPCG:Solvente y Temperatura

4.4.5. OPTIMIZACIÓN Y FUNCIÓN DE DESEABILIDAD

En la Tabla 16 se muestran los valores óptimos para obtener un rendimiento de extracción de proteína soluble de CPCG máxima de 12.59 %, las variables estudiadas como la temperatura debe ser de 79.98 °C con una relación CPCG:solvente 1:31.72, empleando

agua como solvente y un tiempo de 35 min. Con respecto a la deseabilidad se determinó la combinación de factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas, para esto se fijó el máximo valor de deseabilidad ($di = 1$) obteniendo como resultado los valores mostrados en la Tabla 17.

TABLA 16. Valores óptimos de rendimiento de extracción de proteína soluble para el concentrado proteico en polvo de calamar gigante

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
X ₃ : Temperatura (°C)	31.72	88.28	79.98
X ₄ : Relación CPCG:solvente (g/mL)	1:31.72	1:88.28	1:31.72

El valor de deseabilidad máxima se obtuvo en el tratamiento 8 (Tabla 16) con un valor $di = 0.92$, que corresponde a la combinación de temperatura 80 °C y relación CPCG:solvente 1:40, de acuerdo a las directrices de Harrington (1965) dentro de la escala de deseabilidad se refiere a un valor aceptable y excelente ($di = 0.8 - 1.00$).

TABLA 17. Valores de deseabilidad máxima por tratamiento con respecto al rendimiento de extracción de proteína soluble del CPCG

Fila	Rendimiento	Deseabilidad Prevista	Deseabilidad Observada
1	9.82	0.68	0.69
2	10.1	0.84	0.72
3	11.19	0.79	0.82
4	4.2	0.10	0.16
5	9.57	0.68	0.67
6	8.17	0.68	0.53
7	2.56	0.16	0.00
8	13.1	0.92	1.00
9	9.57	0.47	0.67
10	7.98	0.45	0.51
Deseabilidad óptima		0.95	

Por otro lado, para optimizar la deseabilidad a un valor de 0.95 se debería utilizar la combinación de factores experimentales temperatura= 79.98 °C y una relación CPCG:solvente= 1:31.72 para obtener un rendimiento óptimo de 12.59%.

4.5. VALIDACIÓN DEL MODELO

El objetivo de este proceso fue el de validar las respuestas experimentalmente y predecir de acuerdo a la ecuación de segundo orden obtenida al realizar el diseño central compuesto. Bajo esta premisa se comprobó que los valores experimentales encontrados se encontraban de acuerdo a lo estimado por el modelo (Tabla 18).

TABLA 18. Condición óptima del modelo cuadrático, respuesta estimada y experimental

Respuesta	Óptimo	Estimado	Experimental	Rango
Rendimiento de extracción de proteína soluble	12.59	12.20	12.86 ± 0.26	12.20-12.86

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE

La proteína soluble liofilizada (PSL) obtenida del CPCG se caracterizó de acuerdo a su contenido de proteína total, contenido de NNP y su perfil electroforético SDS-PAGE en 1D y 2D.

El resultado obtenido del contenido de proteína total fue de 86 % (bs), mientras que el contenido de nitrógeno no proteico fue de 1.0 mg/g de (PSL) el cual no difirió significativamente de lo obtenido del CPCG en polvo.

La proteína obtenida también fue caracterizada empleando electroforesis, los resultados se presentan en la Figura 12. En la Figura 12 (A) se observa que las principales proteínas características del tejido muscular del calamar gigante como la miosina, paramiosina y actina, le corresponden las bandas de más baja intensidad; al respecto Murphy y Marks (2000) mencionan que, al someter la proteína de pollo a tratamiento térmico de 40 °C, las bandas de 200 kDa que corresponde a la cadena pesada de miosina, tienden a decrecer.

Al respecto Blanco *et al.* (2013) mencionan que, estas proteínas pueden haber sufrido una alta agregación lo que no permite que se liberen de la matriz; también puede atribuirse al efecto de la temperatura sobre la solubilidad de la proteína es bien conocido que la cocción del tejido músculo trae consigo la reducción del rendimiento de procesamiento como la desnaturalización causando la pérdida de la capacidad de retención de agua (Bell *et al.*, 2001). Por otro lado, respecto al tejido conjuntivo estos no se aprecian en el gel, de acuerdo a Torres *et al.* (2008) y Kagawa *et al.* (2000) estas proteínas tienen un peso molecular entre 100 y 180 kDa y son alteradas por efecto de las temperaturas de cocción, por lo que estos componentes han podido ser eliminados durante el proceso de cocción del calamar gigante, Benavides y Villalobos (2013) indican que este tejido se daña severamente y desaparece por solubilización y gelatinización en agua hervida, lo cual permite una liberación de los componentes hidrosolubles conjuntamente con la proteína sarcoplasmática, por lo tanto, se reduce o se eliminan los compuestos responsables del mal sabor del calamar gigante.

En la figura 12 (A) también se observa una banda de 38.37 kDa la cual podría tratarse de una proteína con función reguladora como la tropomiosina, también reportada en otras especies hidrobiológicas como en el arenque (*Clupea harengus*) con un peso de ~35 kDa (Shahidi y Venugopal, 1994); Murphy y Marks (2000) encontraron que las bandas de 43 kDa decrecen cuando las proteínas son tratadas térmicamente a una temperatura de 60 °C. De otro lado Mignino y Paredi (2006), hicieron una comparación entre varias especies de moluscos, como la vieira (*Zygochlamys patagónica*), mejillón (*Aulacomya ater ater*) y calamar (*Illex argentinus*), obteniendo fracciones con un peso molecular de ~35 kDa relacionándola con la tropomiosina. Así mismo, Blanco *et al.* (2013), al someter las muestras a extracción en sal y agua, detectaron bandas por debajo de los 50 kDa. También en la figura 12 (A) se observan bandas alrededor de los 16.52, 18.46 y 26.64 kDa, éstas corresponderían a las diferentes unidades de troponina como: troponina C (~18 kDa), troponina I (~22 kDa) o troponina T (~38.5 kDa), así como, a la cadena ligera de miosina (Pedreschi, 1993; De la Fuente, 2005; Dublán, 2001); En general, podemos observar que las proteínas presentes en el concentrado proteico liofilizado presentan las bandas de mayor intensidad en pesos moleculares por debajo de 21.5 kDa, tal como lo señala Murphy y Marks (2000) quienes demostraron que, las proteínas tratadas a una temperatura de 80 °C presentan bandas de peso molecular menores a 38 kDa. Sotelo *et al.* (2011) reportaron similares resultados indicando que fragmentos de 28.6, 20.4 y 16.5

kDa, pueden corresponder a proteínas reguladoras y productos de degradación de la cadena pesada de miosina y las bandas cercanas a los 20 kDa podrían pertenecer a las cadenas ligeras de la miosina (CLM). Pedreschi (1993) reportó que la presencia de bandas de 14.5 kDa pertenecientes probablemente a la cadena ligera de miosina. Blanco *et al.* (2013) también identificaron bandas de 17 kDa que corresponderían a la cadena ligera de miosina; Samejima *et al.* (1982); Morrisey *et al.* (1986), la definieron como una proteína que interviene dentro de los procesos regulatorios de la contracción muscular y le proporciona sensibilidad al sistema de proteína contráctil en el músculo, dependiendo de la especie, estas proteínas presentan diferencias de estabilidad térmica (Howell *et al.*, 1991), solubilidad, estructura y mecanismo de regulación (Reggiani y Bottinelli, 2008).

Por otro lado, se detectó una banda de bajo peso molecular 14.43 kDa, estas podrían corresponder a una de las fracciones proteicas de la cadena ligera de la miosina; Dublán (2001) menciona que, la miosina está compuesta por 4 cadenas ligeras que tienen un peso molecular entre 14 y 30 kDa respectivamente.

En la Figura 12 (B) se observa el perfil electroforético bidimensional que corresponde a la migración de la proteína de acuerdo a su punto isoeléctrico, en ella se puede observar que las proteínas obtenidas presentan un punto isoeléctrico en el rango ácido entre 3 y 5.4 de pH, los cuales se creen pudieran ser proteínas como tropomiosina (TM), troponinas (T) o residuos de la cadena ligera de miosina (CLM), tomando como referencia el patrón de pesos moleculares obtenidos en el gel de electroforesis de 1D, sin embargo, la intensidad de la coloración de los patrones indicaría la naturaleza de la proteína ya que podría teñirse de color marrón o amarillo, incluso teñirse negativamente contrastando con el gel, por lo que, para poder caracterizarlos de manera adecuada se requiere de mayor investigación incluyendo análisis usando espectrometría de masas así como otras técnicas de análisis.

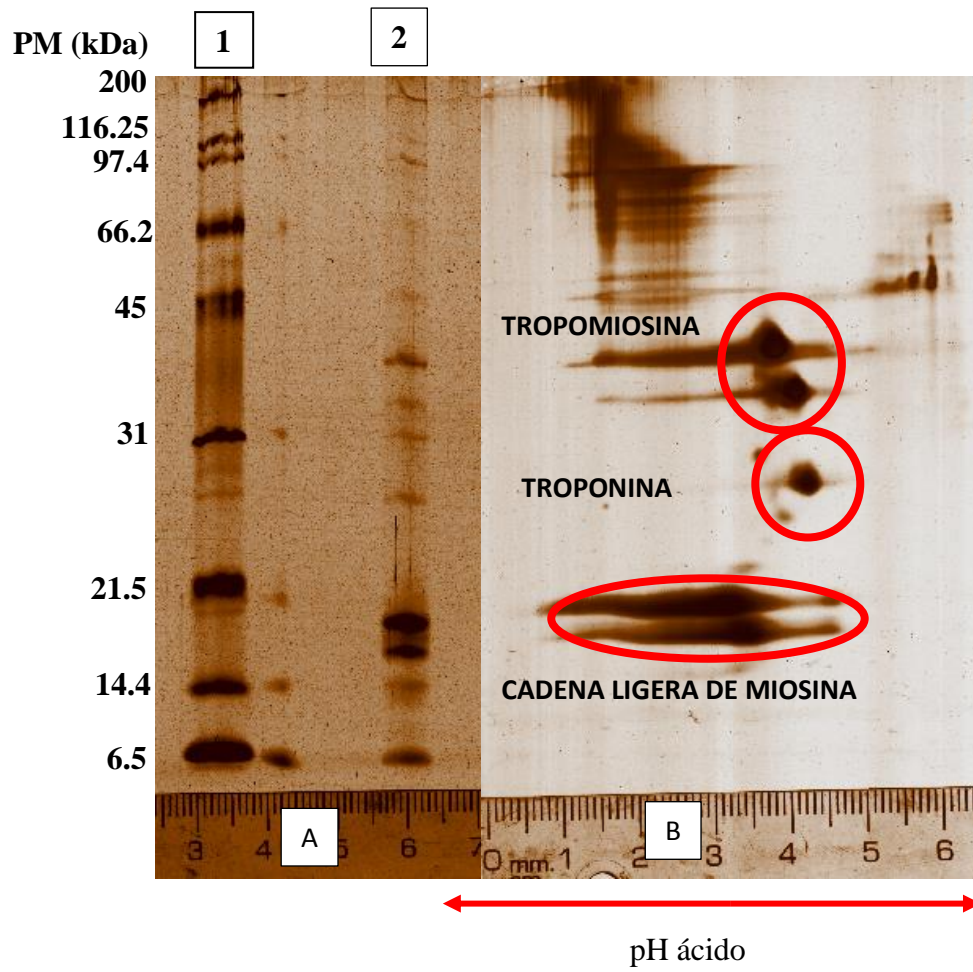


Figura 12. (A) Patrón electroforético: (1) estándar de pesos moleculares de amplio rango, (2) extracto proteico del CPCG, (B) perfil electroforético bidimensional.

V. CONCLUSIONES

- De la etapa de *screening*, se determinó que el tiempo no fue un factor determinante en la extracción de las proteínas solubles del CPCG, mientras que las variables que tuvieron mayor influencia en el rendimiento de extracción de proteína soluble fueron la temperatura, la relación CPCG/Solvente y el agua.
- Los parámetros óptimos de extracción encontrados de la optimización fueron temperatura 79.98 °C, relación CPCG:solvente de 1:31.72, empleando 35 minutos de tiempo de extracción y sin empleo de NaCl, alcanzando un rendimiento óptimo de extracción de 13.1 %.
- La proteína liofilizada, extraída a partir del CPCG, presentó un 86% de proteína total, y un contenido de nitrógeno no proteico de 1.0 mg/g de muestra.
- El perfil electroforético, mostró la presencia de 5 bandas de proteínas predominantes de 14.43, 16.52, 18.46, 26.64 y 38.37 kDa, con puntos isoeléctricos comprendidos entre valores de pH de 3 y 5.4 respectivamente, las cuales corresponderían a proteínas del tipo troponinas, tropomiosinas del tipo I y C además de residuos de la cadena ligera de miosina.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio del perfil de aminoácidos de la proteína soluble obtenida.
- Realizar el estudio de calorimetría a través del barrido electrónico para determinar las propiedades termofísicas de las proteínas solubles obtenidas.
- Evaluar las propiedades tecnofuncionales de la proteína obtenida y su posible aplicación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAFCO (Association of American Feed Control Officials). (2000). Official Publication, Association of American Feed Control Inc. West Lafayette, IN 47971 USA, 444p. Disponible en: www.aafco.org
- Albretch M. s.f. Preguntas frecuentes sobre la calidad de la pota (*Dosidicus gigas*). Consultado: 02 de enero del 2019. Disponible en: www.oannes.org.pe/upload/20160922154605350949975.pdf
- Alamo, V. y Valdivieso, V. 1987. Lista Sistemática de moluscos marinos del Perú. Bol. Inst. Mar Perú – Callao. Vol. Extraordinario 1- 205. Improffset. Callao, Lima. 173 p.
- Alegre, A., Ménard, F., Tafur, R., Espinoza, P., Argüelles, J., Maehara, V., Bertrand, A. 2014. Comprehensive Model of Jumbo Squid *Dosidicus gigas* Trophic Ecology in the Northern Humboldt Current System. PLoS ONE, 9(1), e85919. Doi: 10.1371/journal.pone.0085919
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists, US). 2005. Official Methods of Analysis of the Association the Official Agricultural Chemists. De Board. USA.
- Ayala, J. y Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. CONCYTEC Lima- Perú. p.261.
- Bacio, L. 2007. Optimización multi-objetivo en el problema de metodología de superficie multi-respuesta. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en probabilidad y estadística. Guanajuato-México. p.161.
- Badui, S. 1982. Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana. D.F. México. P. 649.
- Batista, I. 1999. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. Eur Food Res Technol. 210: 84-89.
- Blanco, N., Fernández, F., y Montero, P. (2013). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. LWT - Food Science and Technology, (0).

- Bell, J., Farkas, B., Hale, S., Lanier, T. 2001. Effect of thermal treatment on moisture transport during steam cooking of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *J. Food Sci.* 66 (2), 307–313.
- Benavides, D. y Villalobos, J. 2013. Determinación del efecto de dos soluciones dosiplus y novogam 200/MP en la neutralización y olor amoniacal de la pota (*Dosidicus gigas*). Tesis para optar el título de Agroindustrias e Industrias Alimentarias. Universidad nacional de Piura. Piura.
- Benitez, C. y Valvivieso, V. 1982. Resultados de la Pesca Exploratoria de 1979/1980 y Desembarques de Cefalópodos Pelágicos en el Litoral Peruano. *Bol. Inst. Mar. Perú* – Callao. 10 (5): 105 -139.
- Bio-Rad (s.f.). A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. *Bulletin* 6040. Ver. C. 86 p. Consultado: 15 de junio del 2019. Disponible en: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
- Bravo, V. 2001. Desarrollo de una tabla de evaluación por análisis sensorial del calamar gigante o pota (*Dosidicus gigas*). Lima. Tesis (Médico Veterinario) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. doi:10.1002/elps.1150080203
- Calvo, Ma., Carranco, Ma., Salinas, C, Carrillo, S. 2016 Composición química de harina de calamar gigante *Dosidicus gigas*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 66 N°1: 74-81. ISSN: 0004-0622.
- Carrizoza, M. 2000. Determinación de los Niveles de Bases Volátiles Totales y amonio de muestras comerciales de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Fresco y cocido y su relación con el sabor ácido-amargo. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químicas Biológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora; México.
- Charley H. 1991. Tecnología de los alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. México. Ed. Limusa S.A. 767 p.
- Cheftel J., Cuq J., Lorient D. 1985. Amino acids, peptides, and proteins. In: Owen, RF (ed.), *Food Chemistry*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 275–277.
- Cheng, C., Haman, D., and Webb, N. 1979. Effects of species and storage time on minced fish gel texture. *Journal of Food Science* 44: 1087–1092.

- CIBNOR. 2003. Alternativas para Fortalecer la Cadena Productiva de la Pesquería del Calmar Gigante. Consultada: noviembre 2018. Disponible en: www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_buscador?q=cadenas
- Cortés, J., Pacheco, R., Lugo, M., Carvallo, G. y García, G. 2008. Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) by acid dissolution and isoelectric precipitation. *Food Chemistry*, 110: 486–492.
- Cubillos, L.; Ibañez, C.; González, C. y Sepúlveda, A. 2004. Pesca de la Jibia (*Dosidicus gigas*) con red de cerco entre la v y x regiones, año 2003. Instituto de Investigación Pesquera Talcahuano S.A. Talcahuano.
- Damodarán, S. 1996. Functional Properties. En “Food Proteins: Properties and Characterization”. S. Nakai y H.W. Modler (Eds). VCH Publishers Inc. New York. p. 167-234
- De la Fuente, G. 2006. Proteína de manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*): almacenamiento y procesamiento. Tesis para obtener el grado de Doctor. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La Paz. 92 p.
- Dublán, O. (2001). Evaluación de la actividad proteolítica del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. D.F-México. p. 178. Consultada: agosto 2019. Disponible en: www.remeri.org.mx/portal/REMERI.jsp?id=oai:tesiuami.izt.uam.mx:UAM3137
- Elizondo, P., Serna, S., Chuck, C. 2017. Protein recovery from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) wash water with different pH and temperature combinations. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 16(1): 91-99.
- FAO (1986). Food and Nutrition Paper 14/7 Roma.
- Fennema, O., Tannenbaum, S. 1993. Química de los Alimentos. 2ª Edición. Acribia. España
- Fennema, O. 2008. Química de los alimentos. 3 ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza - España. p. 1258.
- Fennema, O. 2010. Química de los alimentos. 3 ed. Zaragoza – España. Editorial Acribia, S.A. p. 1258.
- Fidantsi, A. y Doxastakis, G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 21(1/3): 119-124.

- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. y Añón, M., 2011. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. En: *Food Chemistry*, 126(3), pp.878-884.
- Gehring, C., Gigliotti, J., Moritz, J., Tou, J. and Jaczynski, J. 2011. Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish byproducts and low-value fish: A review. *Food Chemistry* 124, 422-431.
- Goldberg, S. (2008). Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization. *Methods Mol Biol* 424, 3–22.
- Gómez-Guillén, M., Martínez-Alvarez, O., y Montero, P. 2003. Functional and thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. *Journal of Food Science*, 68(6), 1962–1967.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M., and Shiro, K. 1979. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45(11):1435-1441.
- Harrington, E. (1965). The Desirability Function. *Industrial Quality Control*, 21(10), pp.494-498.
- Hebard, C., Flick, G., and Martin, R. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products* (ed. R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard and D. R. Ward), pp. 149–304. Westport, CT: AVI Publishing Company
- Howell, B., Matthews, A., & Donnelly, A. (1991). Thermal stability of fish myofibrils: a differential scanning calorimetric study. *International Journal of Food Science & Technology*, 26(3), 283-295.
- Huber, L.; Pfaller, K.; Vietor, I. (2003). Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res.* 92, 962–968. 10.1161/01.RES.0000071748.48338.25
- Hultin, H., and Kelleher, S. 2001. Process for Isolating a Protein Composition from Muscle Source and Protein Composition. U.S. patent, 6: 188- 216
- IMARPE. 1993. Trabajo Técnico Científico en Buques Pesqueros. I Curso de Capacitación. Callao. 47 p.
- IMARPE. 1996. Compendio Biológico Tecnológico de las Principales Especies Hidrobiológicas Comerciales del Perú. Instituto del Mar del Perú (IMARPE) e Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). Ed. Stella, Lima. 143 p.

- Ingadottir, B. 2004. The use of acid and alkali-aided protein solubilisation and precipitation methods to produce functional protein ingredients from Tilapia, Master Thesis, University of Florida.
- Ito, Y., Toki, S., Omori, T., Ide, H., Tatsumi, R., Wakamatsu, J., Hattori, A. 2004. Physicochemical properties of water-soluble myofibrillar proteins prepared from chicken breast muscle. *Animal science journal*, 75(1), 59–65. doi:10.1111/j.1740-0929.2004.00156.x
- Kagawa, M; Matsumoto, M; Hatae, M. (2000). Differences in texture among three varieties of squid and the effect of cold storage on the texture. *J. Home Economics of Japan*. Volumen 51, N° 8, 699 – 708 p.
- Kim, S.; Kim, Y.; Byun, H.; Nam, K.; Joo, D. y Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1984–1989.
- Konno, K.; Young-ie, C.; Yoshioka, T.; Shinho, P.; Seki, N. 2003. Thermal denaturation and autolysis profile of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Fisheries Science* 69: 204–209.
- Kuehl, R. 2001. Diseños de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2da ed. Editorial Thomson Learning – US. p. 666.
- Kugino, M., and Kugino, K. (1994). Microstructural and Rheological Properties of Cooked Squid Mantle. *Journal of Food Science*. 59. 792 - 796. 10.1111/j.1365-2621.1994.tb08129.x.
- Laemmli, K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lazo, L. 2006. Elaboración de harina de pota (*Dosidicus gigas*) precocida para consumo humano. Tesis para optar por el Título de Ingeniero Pesquero. UNALM. Lima.
- LeBlanc, E.. and Gill, T. 1982. Comparative study of proteolysis in short-finned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo pealei leseur*) squid. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 201-210.
- Lestari, D., Mulderb, W., y Sandersa, J. 2010. Improving *Jatropha curcas* seed protein recovery by using counter current multistage extraction. *Biochemical Engineering Journal* 50:16–23.

- Licata, M. 2007. Proteínas. Consultada: agosto de 2018. Disponible en: <http://www.zonadiet.com/nutricion/proteina.htm>
- Liu, F; Meng, L; Gao, X; Li, X; Luo, H; Dai, R. (2013). Effect of end point temperature on cooking losses, shear force, color, protein solubility and microstructure of goat meat. *Journal of Food Processing & Preservation*. 37. 10.1111/j.1745-4549.2011.00646.x.
- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lund, D. 1983. Applications of differential scanning calorimetry in foods. En: *Physical properties of foods*. Edit. M. Pelleg y L. Baglye. Conneticut, AVI. 125-155 p.
- Ma, T.; Wang, Q. y Wu, H. 2010. Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 43: 1450-1455.
- Madrid, A., Madrid, J., Madrid, R. 1994. *Tecnología del Pescado y Productos Derivados*. 1ra Edición. AMV Ediciones. Mundiprensa. España. 376 p.
- Makkar, H., Francis, G., Becker, K. 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. *Journal Science Food Agriculture* (88):1542-1548.
- Mariátegui, L. y Taipe, A. 1996. Distribución y Abundancia Relativa del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) en el Perú. *Inf. Progresivo. Inst. Mar Perú-Callao*. Nº 34. Pp 3 – 27.
- Maza, S. 2005. Nuevas alternativas de alimentos congelados a partir de pota (*Dosidicus gigas*). Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Lima.
- Maza, S., Solari, A., y Albrecht-Ruiz, M. 2007. Reducción de la intensidad del sabor ácido amargo de la pota mediante lavados con soluciones ácidas y neutralizantes. Instituto Tecnológico de la Producción. Consultado: diciembre del 2018. Disponible en: repositorio.itp.gob.pe/handle/ITP/27
- Maza, S., Rosales, M., y Castro, R. 2003. Efecto de un proceso de lixiviación ácida salina sobre la calidad del surimi de *Dosidicus gigas* “pota”. *Boletín de Investigaciones del Ins. Tec. Pes. Perú*. Vol. 5: 81-88.
- Mignino, L., and Paredi, M. (2006). Physico-chemical and functional properties of myofibrillar proteins from different species of molluscs. *Food Science and Technology*, 39, 35–42.

- Montgomery, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. Editorial Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega México D.F. p. 686.
- Molina, M. (2017). ¿Qué significa realmente el valor de p?. *Pediatría Atención Primaria*, 19(76), 377-381. scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322017000500014&lng=es&tlng=es.
- Morrissey, P.; Mulvihill, D. y O’Neil, E. 1986. Functional properties of muscle proteins. En *Developments in Food Proteins Vol.5*. Hudson, B. (Ed.). Elsevier Applied Science, London. p. 195-256.
- Murphy, R. y Marks, B. 2000. Effect of meat temperature on proteins, texture, and cook loss for ground chicken breast patties. *Poultry Science*, 79(1), 99–104. doi:10.1093/ps/79.1.99
- Nakagawa, T., Watabe, S., & Hashimoto, K. (1988). Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 54(6), 999–1004.
- Nakaya, H. 1998. Studies on off-Flavor in *Dosidicus gigas*. Large pelagic squids. Tokyo, Japón: Japan Marine Fisheries Resources Research Center. 127-130.
- Nelson, L. y Cox, M. 2001. Principios de bioquímica. 4 ed. Editorial Legninger. España. p. 1776.
- Nesis, K. 1970. The Biology of the Giant Squid of Perú and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology* 10: 108-118.
- Nesis, K. 1983. Cephalopod Life Cycles Vol. I, Species Accounts: *Dosidicus gigas*. Editorial Boyle, Academic Press, London, pp 475.
- Nesis, K. 1987. Cephalopods of the world. T.F.H. Publications Inc., Neptune City, NJ. pp 351.
- Nilo-Rivas, R.; Jane, E.; Dench, P. y Caygill, C. 1981. Nitrogen extractability of sesame (*Sesame indicum L.*) seed and the preparation of two proteins isolate. *Journal Science Food Agriculture* 32: 565 – 571.
- Ochiai, Y y Chow C. (2000). Miosina ATPasa. Norman F (2000), En la utilización Mariscos enzimas y su influencia en la calidad post cosecha. U.S.A: Edition Marcel Dekker, 69 – 70 p.
- Oomah, B.; Mazza, G. y Cui, W. 1994. Optimization of protein extraction from flaxseed meal. *Food Research International* 27: 355 – 361.

- Ordoñez, L. 1994. “Estudio experimental de procesamiento de salado y secado de pota. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Pesquero. U.N.S.A. Arequipa – Perú.
- Ordoñez, L., y Plácido, M. 2004. Aplicación del método del índice de calidad de pota (*Dosidicus gigas*). Instituto Tecnológico de la Producción. Consultado: diciembre del 2018. Disponible en: repositorio.itp.gob.pe/handle/ITP/91
- Otwell, W. and Giddings, G. 1980. Scanning electron microscopy of squid, *Loligo pealei*: Raw, cooked, and frozen mantle. *Marine Fisheries Rev.*, 42(7-8), 67-73.
- Paredi, M., y Crupkin, M. 1997. Biochemical Properties of Actomyosin from Frozen Stored Mantles of Squid (*Illex argentinus*) at Different Sexual Maturation Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM.* 45. 10.1021/jf960776c.
- Paul, P., Buchter, L., y Wierenga, A. (1966). Solubility of Rabbit Muscle Proteins after Various Time-Temperature Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14(5), 490–492. doi:10.1021/jf60147a014
- Pedreschi, F. 1993. Determinación de la composición proteica del músculo del manto de pota (*Dosidicus gigas*), Tesis para optar por el título de ingeniero pesquero, UNALM. Lima-Perú. 85 p.
- Pedreschi, F; Porturas, R. 1998. Estudio y determinación de la composición proteica del músculo del manto de la pota *Dosidicus gigas* (Orbigny). *Anales científicos*. Vol. 35.
- Pedreschi, R. (2009). A proteomics approach to study core breakdown disorder in stored 'Conference' pears. Tesis para optar el grado de Doctor in de Bio-ingenieurswetenschappen. Katholieke Universiteit Leuven.
- Posch, A.; Brubacher, M.; Pulus, A. 2006. Tools for sample preparation and prefractionation in two-dimensional gel electrophoresis. In *Separation Methods in Proteomics*, 107–133. 10.1201/9781420028058.ch8.
- PRODUCE. 2017. Anuario estadístico pesquero y acuícola. Lima. p. 200.
- Radojkovic, M.; Zekovic, Z.; Jokic, S.; Vidovic, S.; Lepojevic, Z. y Milosevic, S. 2012. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technol. Biotechnol* 50(2):167–176.
- Reggiani, C., and Bottinelli, R. 2008. Myosin II: Sarcomeric myosins, the motors of contraction in cardiac and skeletal muscles. In L. M. Coluccio (Ed.), *Myosins*, (pp. 125-169). Dordrecht, the Netherlands: Springer.

- Rodríguez, R. 2002. La Estructura de las Proteínas. Consultado enero 2019. Disponible en: depa.pquim.unam.mx/proteinas/estructura/index.html
- Roldán, D. y Lazo, L. 2009. “Características nutricionales del concentrado de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (CP-Lamolina)”. Artículo aprobado en Anales Científico UNALM.
- Roper C. (1984). Cephalopods of the world (FAO). United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy. 1 – 277 p.
- Roper. C.; Sweeney, M. y Nauen, C. 1984. FAO species catalogue. Vol. 3. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fishery Synopsis 125: 277 pp.
- Rubio, J.; Salazar, C. 1992. Prospección Pesquera del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) a Bordo del Buque Japonés “Shinko Maru 2” (4 de nov–17 de dic. De 1989). Inf. Inst. Mar Perú – Callao, N° 103. p. 31.
- Rudnykh, S. y López, V. 2018. Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajo restricciones. Revista EIA. 12 (30): 13-24.
- Samejima, K.; Ishioroshi, M. y Yasui, T. 1982. Heat induced gelling properties of actomyosin: Effect of tropomyosin and troponin. Agricultural and Biological Chemistry, 46(2): 535-540.
- Sánchez, G. 2002. Identification and characterization of the off-flavor in mantle muscle of Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California. Journal of Aquatic Food Product Technology. 13, 55-66.
- Sánchez, A., Careche, M. y Borderías, A. 2007. Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. Food Chemistry, 100: 48–54.
- Shahidi, F., and Venugopal, V. (1994). Solubilization and thermostability of water dispersions of muscle structural proteins of atlantic herring (*Clupea harengus*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 1440–1446. doi:10.1021/jf00043a010
- Shao, P.; Jiang, S. y Ying, Y. 2007. Distillation for recovery of tocopherol from rapeseed oil deodorizer distillate using response surface and artificial neural network models. Food Bioprod. Process. 85: 85–92.
- Sikorski, Z. 1994. Tecnología de los Productos del Mar: Recursos, Composición nutritiva y Conservación. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. p. 230.

- Sikorski, A. y Kolodziejska, M. 1986. The composition and properties of squid meat. *Food Chem* 20: 213-224.
- Solari-Godiño, A., Córdova-Ramos, J., Pilco-Quesada, S., Cerrón-Mallqui, L., Albrecht-Ruiz, M., Sanchez, J. 2017. Proximal composition and functional properties of lyophilized surimi of *Dosidicus gigas* "jumbo squid ". *Scientia Agropecuaria*. 8. 57-62. 10.17268/sci.agropecu.2017.01.05.
- Sotelo, C. 2011. Efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su relación con los cambios estructurales de las proteínas. Requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y Desarrollo, A.C. Sonora – México. 115 p.
- Stillings, B., and Knobl, G., 1971. Fish Protein Concentrate: A new source of dietary protein. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48(8),412-414.
- Thomas, E.; Wheat, E.; Grumbach, S. y Mazzeo, J. (en línea). Application note. UPLC Amino acid analysis solution. Waters Corporation. Milford, MA, U.S. Consultado: julio 2018. Disponible en:
www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001683en.pdf
- Torres-Arreola, W.; Pacheco, R; Sotelo, R; Rouzaud, O.; Ezquerro, J. (2008) Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante *Dosidicus gigas*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Mx. Vol 6, N° 2, 101-108 p
- Urrutia, W. 2010. Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi (*Lupinus mutabilis*). Tesis para optar el título profesional de ingeniero agroindustrial. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Perú.
- Ventura, M.; Elías, C.; y Salvá, B. 2005. Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón. Lima, Perú. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios, UNALM.
- Vioque, J. y Millán, F. 2005. Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *CTC Alimentación*. 26: 96-102.
- Vioque, J.; Vioque, R.; Pedroche, J.; Del Mar, M. y Millán, F. 2001. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Instituto de la Grasa* 52(2): 127 – 131.

- Voet, D. y Voet, J. 2006. Bioquímica. Tercera edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. p. 1776.
- Watabe, S. 1992. Science of Processing Marine Food Products. Kanagawa International Fisheries Training Centre. Japan International Cooperation Agency. 1, 123-141.
- Wattanachant, S., Benjakul, S., & Ledward, D. 2005. Effect of heat treatment on changes in texture, structure and properties of Thai indigenous chicken muscle. Food Chemistry, 93(2), 337–348. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.032
- Windsor M. y Barlow S. 1984. Introducción a los subproductos de pesquería. Editorial Acribia. Zaragoza - España
- Wormuth, J. 1976. Workshop deliberations on the Ommastrephidae: a brief history of their systematics and a review of the systematics, distribution, and biology of the genera. Edition Systematic and biogeography of cephalopods, U.S.A. Vol II, 373 – 383 p.
- Xiong, Y. 1997. Structure-functionality relationships of muscle proteins. En: Food Proteins and Their Applications. Damoradan, S. y Paraf, A. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York. p. 341-392.
- Xiong, Y. 2004. Muscle proteins. En: Proteins in food processing. Yada, R. (Ed.). Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England. p. 100-122.
- Yamanaka, H., Matsumoto, M., Hatae, H. 1995. Studies of components of Off-flavors in the muscle of American Jumbo squid. Nippon Suisan Gakkaishi, 61,612-618.
- Yenque, K. 2016. Formulación y caracterización de barras energéticas a base de kiwicha (*Amaranthus caudatus linnaeus*) expandida enriquecidas con concentrado proteico de pota (*Dosidicus gigas*). Tesis para optar por el título de ingeniero agroindustrial e industrias alimentarias. Facultad de Ingeniería Industrial. Universidad Nacional de Piura. p. 121.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Tabla para evaluación sensorial del calamar gigante de acuerdo al método del índice de calidad (IMC)

PARÁMETROS		ATRIBUTOS	PUNTAJE
APARIENCIA	Superficie dorsal y ventral	Superficie muy rojo oscuro en el dorso, y más clara en la parte ventral	0
		Superficie aún brillante, dorso gris claro y vientre blanquecido	1
		Superficie sin brillo, dorso y parte ventral de color rojo pardo	2
		Superficie opaca, dorso y parte ventral morados	3
	Ojos	Convexos, claros, traslúcidos	0
		Ligeramente opacos, algo planos	1
		Opacos, hundidos	2
TEXTURA	Músculo (del manto)	Elástico, flexible	0
		Ligeramente blando, resiste la presión dactilar, sin dejar huellas	1
		Muy blando, huellas a la presión dactilar.	2
	Tentáculos	Flexibles, turgentes, ventosas con anillos con capacidad de succión	0
		Algo flácidos, desprendimiento de anillos de las ventosas poca succión	1

Continúa

		Flácidos, ventosas sin anillos, total pérdida de succión	2
OLOR	Superficie del manto (abierto)	Fresco a mar, a algas	0
		Neutro a ligero ácido	1
		Ácido a ligeramente abombado	2
		Amoniacal, a pútrido	3
COLOR	Músculo (sin piel)	Blanco, traslúcido, brillante	0
		Opaco amarillento	1
		Pigmentado de rosado a morado	2
		TOTAL	14

Anexo 2. Tabla de análisis sensorial para harina de pota (*dosidicus gigas*) prepcocida para consumo humano

	Características	Puntaje
Color	Blanco Lechoso	3
	Blanco cremoso	2
	Amarillo opaco	1
Olor	Sin olor a pota	3
	Ligero olor a pota	2
	Con olor a pota	1
Sabor	Sin sabor a pota	3
	Ligero sabor a pota	2
	Con sabor a pota	1
Textura	Suave al tacto y pulverulenta	3
	Áspero y pulverulenta	2
	Duro y granuloso	1

FUENTE: Lazo (2006)

Puntuación	Calidad
10 a 12	Buena
7 a 9	Regular
Hasta 6	Mala

Anexo 3: Determinación de la curva estándar BSA

Con la finalidad de determinar la concentración de proteína soluble contenida en el concentrado proteico en polvo de calamar gigante se elaboró la curva estándar a partir de albúmina sérica de bovino (BSA) con una concentración de 1 ug/ml (Anexo 1), para realizar la lectura de la absorbancia se sometió la muestra a una longitud de onda de 750 nm de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Tabla y Figura respectivamente.

Lectura de absorbancias a 750 nm

BSA (1ug/ul)	Absorbancia (750 nm)
0.1	0.29025
0.2	0.41925
0.3	0.60125
0.4	0.77525
0.5	0.9035
0.6	1.00975

La ecuación resultante que caracteriza la regresión lineal fue:

$$Y = 1.4926X + 0.1441$$

$$R^2 = 0.9927$$

De lo obtenido anteriormente podemos afirmar que el ajuste del modelo es muy bueno ya que el valor R^2 resultante de la regresión corresponde a un 0.9927, lo que representa que un 99.27% de la variabilidad de la respuesta es explicado por el modelo de regresión.

