UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de cambios microestructurales en el músculo de yamú (*Brycon amazonicus*) tratado con un crioprotector bajo dos condiciones de temperatura de almacenamiento

Julián Guillermo León Ramírez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2018

Evaluación de cambios microestructurales en el músculo de yamú (*Brycon amazonicus*) tratado con un crioprotector bajo dos condiciones de temperatura de almacenamiento

Julián Guillermo León Ramírez

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:
Dr. Jairo Humberto López Vargas

Codirectora:
Dra. Adriana Patricia Muñoz Ramírez

Línea de Investigación:
Aseguramiento de la calidad de los alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2018

A mi familia

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia que me ha permitido crecer como ser humano y profesionalmente gracias a sus enseñanzas dentro y fuera de sus aulas de clase.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) y al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores 2015 - 2016 por su compromiso y colaboración con la investigación.

A mis directores, Jairo Humberto López Vargas y Adriana Patricia Muñoz Ramírez por sus consejos académicos y su orientación en el desarrollo de este trabajo. Además, por su calidez humana y sensibilidad para la enseñanza.

A los profesores, José Manuel Lozano Moreno, Milton Josue Crosby Granados y Aquiles Enrique Darghan Contreras, por su incondicional ayuda y su orientación a lo largo de la etapa experimental del proyecto, con total entrega de sus cualidades humanas y amplios conocimientos en sus respectivas áreas.

A mis familiares y amigos, quienes me alentaron para escribir este documento y me apoyaron en todo momento.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto crioprotector del sorbitol incorporado al músculo de yamú (*Brycon amazonicus*), sometido a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. La metodología consistió en analizar cambios microestructurales, perfil proteico y propiedades fisicoquímicas (textura, capacidad de retención de agua y pH) de la carne bajo dos temperaturas (2 ± 2°C y -18 ± 2°C), dos tiempos de almacenamiento (24 y 48 horas) y la incorporación o no de 5 % (p/p) de una solución de sorbitol al 60%. Los cambios microestructurales fueron analizados por medio de microscopia óptica y electrónica de barrido y el perfil proteico se analizó por medio de electroforesis SDS PAGE. El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre tratamientos para las tres variables analizadas. El tratamiento con mayor textura fue el tratamiento 4 (-18°C con sorbitol durante 24 horas) y el de menor textura fue el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). La mayor capacidad de retención de agua fue para el tratamiento 1 (2°C sin sorbitol durante 24 horas) y la menor para el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). El pH más alto lo obtuvo el tratamiento 2 (2°C con sorbitol durante 24 horas) y el más bajo el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). Las propiedades fisicoquímicas evaluadas en la carne de yamú se vieron afectadas principalmente por la interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Las proteínas miofibrilares sufrieron una degradación parcial y se evidenciaron cambios en el tejido conectivo, relacionados con la perdida de textura, especialmente cuando la carne no fue tratada con sorbitol a temperatura de congelación (-18 ± 2 °C). La utilización de sorbitol minimizó los efectos negativos de la congelación sobre las características del músculo de yamú, manteniendo una mayor integridad de la microestructura muscular, generando un efecto crioprotector en comparación a la carne no tratada.

Palabras clave: Actina, colágeno, electroforesis, microscopia, miosina, sorbitol, textura.

Abstract

The aim of this study was to determine the cryoprotective effect of sorbitol incorporated into the yamú muscle (*Brycon amazonicus*), exposed to different storage times and temperatures. The methodology consisted of analyzing microstructural changes, protein profile and physicochemical properties (texture, water holding capacity and pH) of the meat under two temperatures (2 ± 2 °C or -18 ± 2 °C), two storage times (24 and 48 hours) and the incorporation or not of 5% (w/w) of a 60% sorbitol solution. The microstructural changes were analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy; the protein profile was analyzed by SDS PAGE electrophoresis. The treatment with the highest texture was treatment 4 (-18 ° C with sorbitol for 24 hours) and the one with the least texture was treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The highest water holding capacity was for treatment 1 (2 ° C without sorbitol for 24 hours) and the lowest for treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The highest pH was obtained by treatment 2 (2 ° C with sorbitol for 24 hours) and the lowest by treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The physicochemical properties evaluated in yamú meat were affected mainly by the interaction between temperature and storage time. The myofibrillar proteins unerwent a partial degradation and changes in the connective tissue were observed, related to the loss of texture especially when the meat was not treated with sorbitol at freezing temperature (-18 ± 2 °C). Sorbitol minimized the negative effects of freezing on the characteristics of the yamú muscle, maintaining the integrity of the muscular microstructure, generating a cryoprotective effect in comparison to untreated meat.

Key words:

Actin, collagen, electrophoresis, microscopy, myosin, sorbitol, texture.

Contenido

Resumen VIII

Lista de figuras XI

Lista de tablas XII

Introducción 1

Capítulo 1. Utilización de crioprotectores en carne y productos procesados de pescado almacenados a bajas temperaturas 3

1.1 Pérdida de calidad y degradación proteica en pescado o productos a base de pescado almacenados a bajas temperaturas 3
1.1.1 Degradación de las proteínas miofibrilares en el pescado 4
1.1.2 Degradación de proteínas del tejido conectivo 6
1.2 Crioprotección y alteraciones celulares 7
1.2.1 Agentes crioprotectores penetrantes 8
1.2.2 Agentes crioprotectores no penetrantes 8
1.3 Crioprotección en la industria alimentaria 9
1.3.1 Crioprotección en productos a base de pescado 10
1.3.2 Crioprotectores aplicados en músculo de pescado 12
1.4 Aceptabilidad sensorial de los polioles y azúcares 14

Capítulo 2. Evaluación de cambios microestructurales en el músculo de yamú (*Brycon amazonicus*) tratado con un crioprotector bajo dos condiciones de temperatura de almacenamiento 16

2.1 Resumen 16
2.1.1 Abstract 17
2.2 Introducción 17
2.3 Metodología 19
2.3.1 Material biológico 19
2.3.2 Tratamientos experimentales y preparación de muestras 19
2.3.3 Análisis de textura 19
2.3.4 Capacidad de retención de agua (CRA) 20
2.3.5 Medición de pH 20
2.3.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM) 20
2.3.7 Microscopía óptica 20
2.3.8 Extracción de proteínas 21
2.3.9 Cuantificación de proteínas 21
2.3.10 Perfiles de movilidad electroforetica por SDS-PAGE 22
2.3.11 Análisis Estadístico 22
2.4 Resultados y discusión 23
2.4.1 Análisis de textura 23
2.4.2 Capacidad de retención de agua 26
2.4.3 pH 29
2.4.4 Microscopia electrónica de barrido 31
2.4.5 Microscopia óptica 32
2.4.6 Perfiles de movilidad electroforetica por SDS-PAGE 34
2.5 Conclusiones 36

Capítulo 3. Bibliografía 37

Lista de figuras

Figura 1. Variacion de la fuerza de compresion de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. 24
Figura 2. Efecto de la Interacción entre la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable textura. 25
Figura 3. Variacion de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. 27
Figura 4. Efecto de la Interacción entre la incorporacion o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable capacidad de retencion de agua..... 28
Figura 5. Variacion de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. 30
Figura 6. Efecto de la Interacción entre la incorporacion o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable pH. 31
Figura 7. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. F: filete fresco; T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas. 32
Figura 8. Imágenes de microscopia óptica de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. F: filete fresco; T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas..... 33

Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 7 % de acrilamida de extractos proteicos de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Línea F: carne fresca; línea T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; línea T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; línea T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; línea T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; línea T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; línea T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; línea T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; línea T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas; línea MWM: patrón de peso molecular; RMM: masa molecular relativa. 35

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experimental de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.19
Tabla 2. Textura de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Letras diferentes obtuvieron diferencia estadísticamente significativa (P < 0,05) entre tratamientos. 23
Tabla 3. Capacidad de retención de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Letras diferentes obtuvieron diferencia estadísticamente significativa (P < 0,05) entre tratamientos. 26
Tabla 4. pH de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento..... 29

Introducción

El almacenamiento refrigerado y congelado se ha utilizado ampliamente para conservar la calidad sensorial y nutricional de los peces de consumo y subproductos. Alrededor del 50% del total de los productos procesados consumidos, así como el 21% de la producción pesquera total, se ofrece a los mercados en forma de productos congelados (1). Aunque el almacenamiento refrigerado o congelado es capaz de prevenir el deterioro microbiano, no puede mitigar los cambios físicos y químicos, incluyendo la desnaturalización de las proteínas y la oxidación de los lípidos en los productos (2).

La desnaturalización de las proteínas musculares inducida por el proceso de congelación está asociada con el deterioro, especialmente la pérdida de propiedades funcionales y aceptabilidad por parte del consumidor (3). Las reacciones químicas responsables de la oxidación o desnaturalización de las proteínas del pescado se producen especialmente cuando los productos están expuestos a cambios de temperatura durante el almacenamiento prolongado (2, 4).

La desnaturalización de proteínas inducida por congelación seguida de agregación se debe principalmente al desarrollo y crecimiento de cristales de hielo intra o intercelulares (5). Como resultado de la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, en las principales proteínas de los peces y los mariscos se genera una pérdida de propiedades funcionales en la carne, como la capacidad de formación de gel, la pérdida de retención de agua, solubilidad de las proteínas y nutrientes (6, 7).

La miosina del pescado, la principal proteína miofibrilar, es particularmente susceptible a la desnaturalización durante el almacenamiento congelado prolongado a lo largo del tiempo. Las cabezas globulares de esta proteína son responsables de la actividad de la ATPasa y son sensibles a la alteración en la configuración inducida por procesos de congelación o descongelación (3). Además, las reacciones que ocurren entre productos de oxidación lipídica y componentes del músculo de pescado tales como proteínas, aminoácidos, vitaminas y colesterol también provocan degradaciones o modificaciones indeseables de estos componentes como la formación de compuestos carbonilos (7, 8). La formación de carbonilos proteicos a partir de cadenas laterales de aminoácidos está

relacionada con los cambios conformacionales de las proteínas miofibrilares, dando lugar a fragmentación, agregación, pérdida de solubilidad y funcionalidad (3). Estas reacciones perjudiciales conducen a la pérdida de textura o ablandamiento y en general pérdida de calidad y valor nutricional de los productos (8). Por lo anterior, es importante retrasar o prevenir la progresión de este fenómeno para el mantenimiento de la apariencia y la frescura del pescado (9).

Los cambios que se producen en las proteínas de músculo de pescado durante el almacenamiento congelado pueden minimizarse utilizando aditivos crioprotectores apropiados (10). Un crioprotector es una sustancia que protege el tejido biológico del daño por congelamiento al ralentizar la tasa de crecimiento del cristal de hielo (11). Se sabe que los crioprotectores reducen la desnaturalización y/o la agregación de la proteína miofibrilar durante el almacenamiento congelado, manteniendo de este modo las propiedades funcionales, tales como la capacidad de formación de gel, la capacidad de retención de agua y la solubilidad de las proteínas (3, 12).

El yamú (*Brycon amazonicus)* es la especie más común entre los bryconidos. Nativa de los Llanos Orientales colombianos, y la más explorada para piscicultura dado su hábito alimenticio omnívoro, su rápido crecimiento y eficiencia alimenticia, óptimo sabor de su carne y sus especiales características para la pesca deportiva (13). Sin embargo, el músculo de yamú es altamente susceptible a la pérdida de calidad inducida durante el almacenamiento congelado. Actualmente, no hay información científica disponible sobre el efecto crioprotector del sorbitol en la carne de esta especie. Por tal razón, éste estudio tuvo como objetivo determinar el efecto crioprotector del sorbitol incorporado al músculo de yamú, sometido a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

Capítulo 1. Utilización de crioprotectores en carne y productos procesados de pescado almacenados a bajas temperaturas

1.1 Pérdida de calidad y degradación proteica en pescado o productos a base de pescado almacenados a bajas temperaturas

La calidad es la capacidad de un producto de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características (en el caso del pescado la apariencia, frescura, inocuidad y método de almacenamiento); así, la adecuación del termino calidad es definido por el usuario o consumidor (14).

La frescura es uno de los principales atributos de calidad general del pescado y sus productos, puesto que son conocidos por ser muy vulnerables y perecederos. Ya sea que el pescado se utilice como materia prima para la industria alimentaria o para el consumo directo, para aumentar la vida útil y reducir la tasa de degradación bioquímica y microbiana, se han utilizado diferentes métodos de conservación, principalmente basados en bajas temperaturas, para su distribución y almacenamiento (15).

Los métodos de conservación en pescados más utilizados incluyen almacenamiento congelado de -18 a -40°C, almacenamiento refrigerado entre 0 y 4°C y almacenamiento súper refrigerado de -1 a -3°C. La súper refrigeración, que también se denomina enfriamiento profundo o congelación parcial, se utiliza a menudo para describir un proceso en el que los productos alimenticios se almacenan entre el punto de congelación del producto y 1°C por debajo de este nivel. Los puntos iniciales de congelación de la mayoría de los productos alimenticios están entre -0,5 °C y -2,8°C (16). La vida útil de los alimentos súper refrigerados puede extenderse 1,5 a 4 veces en relación con los alimentos

refrigerados y debería ser una alternativa atractiva a la congelación y al enfriamiento convencional (17).

La formación de cristales de hielo durante la congelación perjudica la ultra estructura del músculo de los peces, lo que a su vez provoca alteraciones en las reacciones bioquímicas que se producen a nivel celular e influyen en los parámetros de calidad física de la carne (18). Debido a una velocidad de congelación diferente entre el exterior y el interior de la célula, la formación de cristales de hielo y la concentración de soluto aumentada se produce fuera de la célula. La concentración desequilibrada del soluto conduce posiblemente a la migración de la humedad del interior de la célula al espacio extracelular debido a la ósmosis, dando por resultado el crecimiento de cristales de hielo (19).

1.1.1 Degradación de las proteínas miofibrilares en el pescado

Las proteínas miofibrilares son responsables de las propiedades funcionales tales como gelificación, capacidad de retención de agua y la ligazón en productos cárnicos. A pesar de tener similitudes en la funcionalidad entre especies, las proteínas musculares del pez exhiben características únicas. La principal es la reducción de la estabilidad en almacenamiento congelado (20), por lo que se ha propuesto que tales diferencias podrían atribuirse al hecho que los peces son animales poiquilotermos (su temperatura corporal varía con el ambiente y su actividad depende de él), mientras que las aves de corral y los mamíferos son homeotermos (son capaces de mantener una temperatura constante e independiente a la del ambiente) (21).

La desnaturalización de proteínas del pescado y sus productos debido a la refrigeración o al almacenamiento congelado ocurre por la disminución de la solubilidad de las proteínas miofibrilares (principalmente miosina), desaparición de la contracción inducida por ATP de la fibra muscular y disminución de la actividad de la ATPasa de la miosina (2). Las proteínas de la mayoría de los peces son conocidas por ser más propensas a la desnaturalización que las proteínas contráctiles de los homeotermos (22). La miosina y la actina, las principales proteínas contráctiles, son en gran parte responsables de las propiedades funcionales de la carne, por lo cual la variación en la estabilidad de la carne de diferentes especies de peces en el almacenamiento a bajas temperaturas, puede atribuirse en cierta medida a las características intrínsecas de las respectivas miosinas (23). La secuencia de

aminoácidos dicta la estructura tridimensional de una proteína y por lo tanto su estabilidad termodinámica, distribución de carga y características hidrofóbicas que son importantes para la relación de función estructural (24).

El deterioro de la calidad, especialmente en la textura, el sabor y el color, se producen durante la refrigeración y el almacenamiento congelado debido a la eliminación osmótica del agua, la desnaturalización de la miosina, el daño mecánico, así como la fragmentación y agregación de proteínas miofibrilares (18). Las dos principales proteínas miofibrilares, miosina y actina, son responsables de los ciclos de contracción y relajación muscular. La miosina, que es la fracción más abundante de estas proteínas, constituye del 60% al 70% de su cantidad total y forma los filamentos gruesos mientras que la actina, que va del 15 al 20%, es el componente principal de los filamentos delgados (25). Las proteínas miofibrilares incluyen proteínas contráctiles como miosina y actina, proteínas reguladoras como tropomiosina y troponina, y otras proteínas menores (26). Estas proteínas, son propensas a oxidación y desnaturalización durante el almacenamiento congelado (8). Sus propiedades afectan enormemente la calidad final de la carne, especialmente la miosina, que es responsable de la actividad muscular (27).

La modificación oxidativa de las proteínas de pescado y específicamente de las proteínas miofibrilares está generalmente relacionada con los cambios indeseables en las propiedades funcionales, nutricionales y sensoriales de la carne incluyendo gelificación, emulsificación, viscosidad, solubilidad y capacidad de retención de agua. Además, ocurre oxidación de las proteínas sarcoplásmicas, que constituyen entre el 20 y el 30% de las proteínas totales del pez, lo cual conduce a la decoloración del músculo (28).

Hay tres teorías que describen alteraciones en el microambiente de las proteínas que causan la desnaturalización de estas mismas durante el almacenamiento congelado: la primera es un aumento en la concentración de solutos; la segunda es la deshidratación de las células y, por último, los cambios auto oxidativos que alteran el equilibrio de proteína - proteína y las interacciones proteína – agua (29). Es posible que la secuencia de aminoácidos sea la respuesta. Sin embargo, las miosinas en peces aún no han sido estudiadas para determinar su estructura, debido al gran número de especies existentes, al alto peso molecular de esta proteína (> 200 kDa) y a la complejidad de la determinación de la secuencia de aminoácidos (20).

La desnaturalización y la agregación de proteínas miofibrilares se asocia con la pérdida de calidad. La alteración de las proteínas de los peces durante la congelación y el almacenamiento congelado está generalmente asociada con la deshidratación parcial de la proteína, un aumento de la concentración de sal en la fase no congelada y la interacción de

lípidos, ácidos grasos libres y/o productos de oxidación lipídica con proteínas (2). La liberación de enzimas dada por la descomposición de la membrana lisosomal da como resultado la desnaturalización de las proteínas miofibrilares mediante la producción de formaldehído durante el almacenamiento congelado (30).

1.1.2 Degradación de proteínas del tejido conectivo

Las proteínas del estroma, o tejido conectivo, constituyen aproximadamente el 3% del total de las proteínas en teleósteos y cerca del 10% en elasmobranquios. Estas proteínas son insolubles en agua y soluciones salinas. Son las proteínas responsables de la firmeza de la carne (tejido conectivo que mantiene juntas las células musculares) y están formadas principalmente por el colágeno y en menor proporción por la elastina (4:1) (27). Actualmente es aceptado que existen distintos colágenos, química y genéticamente diferentes, entre mismos individuos. En peces, en el tejido conectivo peri celular es reconocida la existencia de colágeno tipo I y en mayor proporción colágeno tipo V; este último ha sido sugerido como posible responsable de la textura post-mortem (31), debido a que la fibra de colágeno tipo V presenta menor diámetro, frente a la fibra de colágeno tipo I; además, el diámetro de las fibras de colágeno disminuye con el incremento de la proporción de colágeno tipo V en el músculo (32). Se ha aclarado, por observaciones histológicas, que el endomisio, una parte del tejido conectivo, se debilita con la progresión del ablandamiento post-mortem y que las fibrillas de colágeno, que constituyen el endomisio, se descomponen paralelamente al debilitamiento del mismo. Sin embargo, las fibrillas de colágeno de la miocomata, que ocupan la mayor parte del colágeno muscular, no muestran ningún cambio. La localización de las fibrillas de colágeno degradadas plantea la posibilidad de que las fibrillas de colágeno tengan diferentes características dependiendo de su ubicación (9).

El ablandamiento *post mortem* en los peces es una característica que determina la calidad, puesto que la firmeza del músculo es un índice de frescura de la carne, de forma que el ablandamiento resulta en una disminución de tal calidad. Lo anterior está directamente influenciado por el tipo de colágenos presentes en cada especie y la degradación del colágeno está relacionada con los fenómenos que acontecen durante el almacenamiento en frío (33). El análisis del colágeno tipo V es dispendioso ya que es un constituyente menor. Los estudios de la relación entre el ablandamiento post mortem y el contenido de colágeno tipo V sólo se han realizado en la trucha arco iris (34), sardina y pez globo (35); incluso en

esos reportes, el tiempo de medición de la firmeza de la carne se limitó a 0 y 24 h después del sacrificio. Casi toda la carne de pescado se ablanda dentro de un día de almacenamiento en frío y la velocidad del procedimiento de ablandamiento varía de acuerdo a la especie de pez (36); es por lo anterior que la correlación entre la tasa de ablandamiento y la cantidad de colágeno tipo V aún no está clara (9).

Ha sido reportada pérdida de textura del músculo de pez amazónico yamú (*Brycon amazonicus)* durante el almacenamiento en frío, encontrada principalmente en el tejido conectivo, evidenciando la degradación del colágeno en la estructura miofibrilar, representada en la pérdida de textura, presencia de *gaping* (ocurre cuando el tejido entre los bloques musculares llamado miosepto y los bloques se separan*)* y malformaciones superficiales (37), tornándose en un factor muy importante para evaluar la calidad de la carne de pescado y fundamental al momento de comercializarla (33). Algunos peces muestran una mayor propensión al *gaping* que otros, lo que comercialmente es un problema (38), ya que hace que el consumidor lo rechace por su apariencia y textura, además haciendo el procesamiento de la carne mucho más difícil debido a la perdida de sus propiedades tecnológicas.

1.2 Crioprotección y alteraciones celulares

La criopreservación o crioconservación es la rama de la criobiología (estudio de la vida a bajas temperaturas) por medio de la cual se espera prolongar indefinidamente el potencial total de vitalidad y las funciones metabólicas normales de las células. Por medio de este proceso se busca la estabilización de las células a temperaturas de hasta -196 °C en la que se detiene la actividad metabólica, permitiendo su preservación por periodos de tiempo indefinidos (39).

Las células tienen diferente tamaño y manejan diferente composición de solutos; en general el éxito de la criopreservación es inversamente correlacionado con la complejidad de los sistemas biológicos congelados. Criopreservar células suele ser más fácil a diferencia de hacerlo en ciertos tejidos debido a la compartímentalización de estos últimos, lo que lo hace mucho más complejo (40). La membrana plasmática de la célula eucariota, independientemente de su composición, tiene una estructura organizada según el modelo de mosaico fluido (41). Estas membranas se componen básicamente de lípidos anfipáticos (moléculas que poseen un extremo hidrofílico, es decir, que es soluble en agua y otro que

es hidrófobo, lo cual significa que rechaza el agua) proteínas y un pequeño porcentaje de carbohidratos que es variable de acuerdo al tipo y especie celular.

El transporte de moléculas a través de la membrana es el punto crítico para la supervivencia celular durante y después de la descongelación. Es conocido que las membranas son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de congelación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos; la transición de lípidos fluidos a sólidos se da a una temperatura entre 10°C y 16°C, alterando las funciones de la membrana. Durante la deshidratación celular a lo largo del proceso de congelación se presenta una pérdida de lípidos, que afecta la integridad de la membrana por pérdida de su capacidad de expansión durante la rehidratación (42).

1.2.1 Agentes crioprotectores penetrantes

Los agentes crioprotectores penetrantes son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Son utilizados el dimetilsulfoxido (DMSO), propanediol (PROH) y el glicerol. El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar aprótico (son solventes polares que no tiene enlaces O-H o N-H y no da ni acepta protones), hidrosoluble y de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades se ha usado como un crioprotector (43). Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana; su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular (44), modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, también afecta los procesos de solvatación de agua. Sustancias como el 1-2 propanediol y el glicerol son utilizadas principalmente para congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación de humanos y otras especies (45).

1.2.2 Agentes crioprotectores no penetrantes

Los agentes crioprotectores no penetrantes son sustancias de alto peso molecular, efectivos a velocidades altas de congelación, que son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular, siendo usados

asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo su actividad. La adición del criopreservante por si misma genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los crioprotectores, para una posterior hidratación (46).

1.3 Crioprotección en la industria alimentaria

A pesar de las ventajas de la congelación, esta provoca ciertos cambios desfavorables en la calidad de la carne de pescado. El hielo ocupa un volumen mayor que el agua, y la exclusión de solutos a partir de cristales de hielo provoca un aumento de la fuerza iónica en el agua. En conjunto, estos fenómenos provocan una pérdida en la estructura de algunas proteínas del músculo y por ende de los tejidos (47).

Para evitar cambios en la funcionalidad y estructura de las proteínas, se añaden comúnmente sustancias crioprotectoras para asegurar la máxima funcionalidad de los productos congelados de pescado o mariscos, ayudando a minimizar la desnaturalización y/o agregación de proteínas miofibrilares durante la congelación o el almacenamiento congelado prolongado (12, 48). De esa manera se pueden mantener o mejorar las propiedades tecnológicas del tejido muscular, tales como capacidad de formación de gel, capacidad de retención de agua y solubilidad de proteínas. Así, la vida útil de los pescados y mariscos congelados puede extenderse mediante el uso de crioprotectores (47, 49-51).

Diversas sustancias como azúcares, alcoholes de azúcar y polifosfatos han sido investigadas como crioprotectores contra la desnaturalización inducida por congelación de la proteína miofibrilar (52). Las más comúnmente utilizadas en la industria por su eficacia son sacarosa, sorbitol, maltodextrinas y polidextrosa (53, 54).

En la industria alimentaria se hace extensivo el uso de monosacáridos como la glucosa, disacáridos como la sacarosa, polisacáridos como la polidextrosa, más conocidos como azúcares, y los polioles como el sorbitol, que son alcoholes derivados de azúcares, que tienen como función añadir volumen y textura a los alimentos; esas sustancias tienen capacidad edulcorante, además de ayudar a retener humedad, sin causar caramelización cuando se calientan (55). Los crioprotectores mencionados aumentan la tensión superficial del agua, así como la cantidad de agua ligada, por lo que la salida de las moléculas de agua de las proteínas se retrasa, estabilizando así las proteínas. La migración de agua durante la congelación o el almacenamiento congelado se asocia con la interrupción de los enlaces de hidrógeno entre la proteína y el agua o el complejo proteína-proteína. El efecto estabilizador también es causado al mejorar la fuerza de interacción intramolecular hidrofóbica de las moléculas de proteínas (2).

Los aditivos crioprotectores ofrecen un medio organolépticamente aceptable y de bajo costo que extiende la calidad durante el almacenamiento congelado. La inyección de crioprotectores en carnes también puede minimizar el daño debido a la congelación, pero la distribución uniforme de crioprotectores dentro de los componentes del tejido puede ser más difícil que para el surimi (22). Los crioprotectores mejoran la calidad y prolongan la vida útil de los alimentos congelados mediante la prevención de cambios perjudiciales en las proteínas causados por la congelación, el almacenamiento congelado y la descongelación. Hay muchos crioprotectores utilizados en los alimentos congelados, pero de los mencionados anteriormente la mezcla (1:1) de sacarosa / sorbitol es la más común, usada comercialmente en productos pesqueros como el surimi debido a su alta disponibilidad y bajo costo (29).

1.3.1 Crioprotección en productos a base de pescado

Los crioprotectores se añaden comúnmente al surimi para minimizar la desnaturalización de las proteínas causada por el proceso de congelación. El surimi

es un concentrado húmedo de la proteína miofibrilar que se puede producir tanto de peces marinos como de agua dulce (56). Aparte de una mezcla de sacarosa con sorbitol (5% de sacarosa y sorbitol al 4%), los polifosfatos utilizados en la fabricación de surimi son pirofosfato sódico y una mezcla de tripolifosfato sódico y pirofosfato sódico. Aunque la cantidad de polifosfato añadido depende del tipo de surimi, generalmente se añaden al surimi polifosfatos de 0,2 a 0,3% (p / p). Los polifosfatos ajustan (aumentan) el pH, aumentan la fuerza iónica, tienen la capacidad de quelar los iones Ca y Mg y disocian miosina y actina (19, 52).

Diversos autores han estudiado el uso de potenciales crioprotectores sobre productos preparados a base de carne de pescado. En Brasil fue evaluado el efecto de tres tratamientos con diferentes mezclas de crioprotectores (A) 2% de sacarosa, 2% de sorbitol y 0,1 % de tripolifosfato de sodio (B) 4% de sacarosa, 4% de sorbitol y 0,3 % de tripolifosfato de sodio y (C) 6% de sacarosa, 6% de sorbitol y 0,5 % de tripolifosfato de sodio en la formulación de surimi de yamú (*Brycon amazonicus)* almacenado a -18°c; fue realizado un análisis de capacidad de retención de agua (57) y de SDS-PAGE (58) cada 30 días durante 120 días, reportando que el crioprotector con las concentraciones más altas ((C) 6% de sacarosa, 6% de sorbitol y 0,5 % de tripolifosfato) permitió obtener un producto con mejores resultados en cuanto a la estabilidad bajo congelación, una mejor capacidad de retención de agua y la mitigación de la desnaturalización de las proteínas. Los autores resaltan que durante el almacenamiento la miosina de cadena pesada fue la más propensa a la degradación, lo cual fue observado gracias a los geles obtenidos por medio de SDS-PAGE (59). De manera similar, fue analizado el efecto de soluciones de sorbitol, sacarosa, y glutamato monosódico sobre un complejo de actomiosina extraído de carpa (C*yprinius carpio)* sometido a congelación a -18°C, con resultados similares al anterior estudio, donde los autores enfatizan que, mientras las soluciones de sorbitol y sacarosa estabilizan las proteínas y retrasan su desnaturalización, el glutamato monosódico actúa como antioxidante, pero no protege la estructura de las proteínas (60).

Los efectos de la súper refrigeración (-1 y -3°C)combinada con crioprotectores (una mezcla de sacarosa y sorbitol, 1:1) sobre la oxidación de proteínas y cambios estructurales fueron estudiados en el surimi de carpa común (*Cyprinus carpio*) (56), encontrando que la incorporación de crioprotectores en el surimi de carpa común inhibe significativamente la formación de carbonilos proteicos; su contenido de carbonilos fue significativamente más bajo que en las muestras super refrigeradas de -1 ° C y -3 ° sin crioprotector, reduciendo así los cambios estructurales de las proteínas que se sabe que deterioran la textura de los productos de surimi. Fue posible explicar que el uso de la super refrigeración sin crioprotectores causa daños por congelación al formar cristales de hielo intra y extracelulares, destruyendo la estructura celular e induciendo la liberación de enzimas oxidativas. Además, se encontró que la utilización de crioprotectores disminuye el punto de congelación del surimi de -1°C a -3°C (61).

La inhibición de varios compuestos [tripolifosfato de sodio (STPP), pirofosfato tetrasódico (TSPP), STPP / TSPP, pirofosfato trisódico (3SP), hexametafosfato de sodio (SHMP) y fosfato disódico anhidro)] sobre la desnaturalización y agregación fisicoquímica de las proteínas fue determinada utilizando un sistema de actomiosina natural extraída de pescadilla del Pacífico (*Merluccius gayi*) con o sin adición de crioprotectores (4% de sorbitol y 5% de azúcar) (5). El STPP fue el compuesto más eficaz en el retraso tanto de la desnaturalización de proteínas y la agregación inducida por congelación. La actomiosina sin crioprotectores fue más rápidamente desnaturalizada y agregada que la que si contenía crioprotectores.

1.3.2 Crioprotectores aplicados en músculo de pescado

Diversos estudios han sido realizados para evaluar la efectividad de crioprotectores aplicados en el músculo de pescados. Para el caso de filetes de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss)* fue evaluada la estabilización de las proteínas miofibrilares a -20 °C, durante 90 días de almacenamiento y después de descongelar los filetes en agua, realizando una inmersión en soluciones al 8,0% de sacarosa / sorbitol, o lactato de sodio

1,0% y con o sin 0,5% de fosfato y con o sin 0,05% de cloruro de magnesio para un total de 12 tratamientos; los autores encontraron que las soluciones de sacarosa / sorbitol proporcionaron una crioprotección más eficaz que el lactato de sodio en la preservación de la estructura de las proteínas (29). Posterior a dicho ensayo, los mismos autores (62) evaluaron el efecto crioprotector sobre las propiedades fisicoquímicas (textura, pH, rendimiento en cocción, y color) de carne reestructurada de la misma especie, incluyendo en la formulación 8% (p/p) de sacarosa / sorbitol (1:1 p/p), 8% (p/p) trehalosa, 8% (p/p) de trehalosa / sorbitol (1:1 p/p) o 2% (p/p) lactato de sodio, reportando que las fórmulas con sacarosa, sorbitol y trehalosa pueden ser utilizadas por igual como crioprotectores basándose en los resultados obtenidos para pérdidas por descongelamiento y de textura por medio de un análisis de tensión y compresión, mientras que el lactato de sodio no fue efectivo en la crioconservación de la carne.

En el caso de la merluza roja (*Urophycis chuss)* se evaluó la inyección de varios crioprotectores (sorbitol y TPFS 40% a 60%: 3%; 1,5% de alginato, o 0,75% de alginato con APS, sorbitol y TPFS 5% a 10%: 40%: 3%), sobre la estabilidad de congelación y descongelación y la mejora de la textura del músculo, por medio de análisis instrumental con equipo de medición de fuerza de corte, análisis de SDS-PAGE y análisis sensorial calificado por escala hedónica de 1 a 9 por medio de panel entrenado. Los autores encontraron que los filetes inyectados con 10% de APS, 1,5% de alginato o 0,75% de alginato-5% APS con un 40% de sorbitol y el 3% de TPFS mostraron la mejor capacidad de retención de agua, textura y gusto general, afirmando que la inyección de crioprotectores mejoró la capacidad de retención de agua; gracias a las imágenes obtenidas por SDS-PAGE fue observado que no varió el tamaño de las bandas para actina y miosina, infiriendo una baja desnaturalización de dichas proteínas, retrasando las interacciones intermoleculares (63).

La incorporación de crioprotectores de bajo peso molecular en músculo intacto de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss)*, por medio de la inyección con una solución a diferentes concentraciones de sorbitol (0, 20, 30, 45, 60 %) y la inmersión o no en una solución de sorbitol al 25%, dio como resultado que, a concentraciones más altas hubo una mayor retención de sorbitol en el músculo. Además, tanto los tratamientos de solo inyección, solo inmersión y la combinación de inyección con inmersión, arrojaron excelentes resultados en cuanto a la crioprotección de la carne en términos de contenido de humedad, retención de sorbitol en músculo y cambios en la actividad de miosina ATPasa. Sin embargo, en los tratamientos donde se aplicó inyección e inmersión, se presentaron pérdidas de rendimiento

bastante altas expresadas en cambios en la humedad y el peso de las muestras, dando como recomendacion la inyección de 5% p/p de la solución de sorbitol al 60% sin inmersión como la opción más valida (22).

1.4 Aceptabilidad sensorial de los polioles y azúcares

Los polioles son sustancias cristalinas de sabor ligeramente dulce a muy dulce. Son generalmente edulcorantes con calorías reducidas que se pueden usar en la misma cantidad que la sacarosa, aunque no tienen el mismo grado de dulzura (55), por lo que su aplicación está limitada por su dulzura. La intensidad de la dulzura es diferente para cada poliol y las sensaciones sensoriales más complejas (el tiempo transcurrido de la sensación de dulzor y de sabor) también son diferentes. En este sentido, se realizó un análisis sensorial de los diferentes crioprotectores comúnmente utilizados disueltos en soluciones acuosas (sacarosa, sorbitol, maltodextrina y polidextrosa) para preservar las características funcionales en carnes (47). El análisis se llevó a cabo con un panel entrenado conformado por 8 personas entre los 40 y los 50 años de edad, teniendo en cuenta como principales factores el grado de dulzura y el tiempo de intensidad del sabor. Los resultados del ensayo indicaron que la polidextrosa es el crioprotector con mayor aceptabilidad sensorial, seguido por el sorbitol debido a su bajo grado de dulzura e impacto total de sabor en general; sin embargo, este análisis no fue hecho directamente en la carne, sino en soluciones acuosas por lo cual el autor recomienda realizar el ensayo sobre la carne para así evitar reacciones desconocidas entre la sustancia y la carne de pescado, res, cerdo o pollo. La dulzura de carbohidratos seleccionados y edulcorantes de alta resistencia, tales como sacarosa, fructosa, aspartame, ciclamatos, acesulfame K y sacarina, también se evaluaron mediante este método por otro autor, encontrando resultados similares, con preferencia por la polidextrosa por su baja capacidad edulcorante (64).

1.5 Conclusiones

Los crioprotectores mejoran significativamente la calidad de filetes y productos de pescado susceptibles al daño por congelación, minimizando los efectos negativos del almacenamiento en frío, especialmente sobre los cambios que pueden sufrir las proteínas miofibrilares como la degradación de la miosina y la actina, principales proteínas del músculo. El uso de estos protectores asegura buena textura, apariencia, aceptabilidad por parte del consumidor y propiedades funcionales como

la capacidad de retención de agua, pH, capacidad emulsificante y capacidad de formación de gel siempre y cuando se asocien con técnicas de congelación adecuadas. Estos efectos positivos de los crioprotectores se presentan especialmente cuando se utilizan carbohidratos como la sacarosa, o polioles como el sorbitol en la formulación de productos procesados a base de pescado, e incluso cuando se utiliza su incorporación en los filetes de diferentes especies, indicando estos aditivos como una muy buena opción para ser utilizados en la crioprotección de carne y productos de pescado por los resultados obtenidos en la estabilidad de las proteínas miofibrilares y su disponibilidad.

Capítulo 2. Evaluación de cambios microestructurales en el músculo de yamú (*Brycon amazonicus*) tratado con crioprotector bajo dos condiciones de temperatura de almacenamiento

2.1 Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto crioprotector del sorbitol incorporado al músculo de yamú (*Brycon amazonicus*), sometido a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. La metodología consistió en analizar cambios microestructurales, perfil proteico y propiedades fisicoquímicas (textura, capacidad de retención de agua y pH) de la carne bajo dos temperaturas (2 ± 2°C y -18 ± 2°C), dos tiempos de almacenamiento (24 y 48 horas) y la incorporación o no de 5 % (p/p) de una solución de sorbitol al 60%. Los cambios microestructurales fueron analizados por medio de microscopia óptica y electrónica de barrido y el perfil proteico se analizó por medio de electroforesis SDS PAGE. El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre tratamientos para las tres variables analizadas. El tratamiento con mayor textura fue el tratamiento 4 (-18°C con sorbitol durante 24 horas) y el de menor textura fue el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). La mayor capacidad de retención de agua fue para el tratamiento 1 (2°C sin sorbitol durante 24 horas) y la menor para el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). El pH más alto lo obtuvo el tratamiento 2 (2°C con sorbitol durante 24 horas) y el más bajo el tratamiento 7 (-18°C sin sorbitol durante 48 horas). Las propiedades fisicoquímicas evaluadas en la carne de yamú se vieron afectadas principalmente por la interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Las proteínas miofibrilares sufrieron una degradación parcial y se evidenciaron cambios en el tejido conectivo, relacionados con la perdida de textura, especialmente cuando la carne no fue tratada con sorbitol a temperatura de congelación (-18 ± 2 °C). La utilización de sorbitol minimizó los efectos negativos de la congelación sobre las características del músculo de yamú, manteniendo una mayor integridad de la microestructura muscular, generando un efecto

crioprotector en comparación a la carne no tratada.

Palabras clave:

Actina, colágeno, electroforesis, microscopia, miosina, sorbitol, textura.

2.1.1 Abstract

The aim of this study was to determine the cryoprotective effect of sorbitol incorporated into the yamú muscle (*Brycon amazonicus*), exposed to different storage times and temperatures. The methodology consisted of analyzing microstructural changes, protein profile and physicochemical properties (texture, water holding capacity and pH) of the meat under two temperatures (2 ± 2 °C or -18 ± 2 °C), two storage times (24 and 48 hours) and the incorporation or not of 5% (w/w) of a 60% sorbitol solution. The microstructural changes were analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy; the protein profile was analyzed by SDS PAGE electrophoresis. The treatment with the highest texture was treatment 4 (-18 ° C with sorbitol for 24 hours) and the one with the least texture was treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The highest water holding capacity was for treatment 1 (2 ° C without sorbitol for 24 hours) and the lowest for treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The highest pH was obtained by treatment 2 (2 ° C with sorbitol for 24 hours) and the lowest by treatment 7 (-18 ° C without sorbitol for 48 hours). The physicochemical properties evaluated in yamú meat were affected mainly by the interaction between temperature and storage time. The myofibrillar proteins unerwent a partial degradation and changes in the connective tissue were observed, related to the loss of texture especially when the meat was not treated with sorbitol at freezing temperature (-18 ± 2 °C). Sorbitol minimized the negative effects of freezing on the characteristics of the yamú muscle, maintaining the integrity of the muscular microstructure, generating a cryoprotective effect in comparison to untreated meat.

Key words:

Actin, collagen, electrophoresis, microscopy, myosin, sorbitol, texture.

2.2 Introducción

La congelación se utiliza generalmente para conservar la calidad sensorial y nutricional de los pescados y sus productos (1)**,** sin embargo, no puede mitigar los cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento (2). Debido a una velocidad de congelación diferente entre el

exterior y el interior de la célula, se genera la reducción de la humedad del interior de la célula al espacio extracelular, dando por resultado el crecimiento de cristales de hielo (19), que sumados a los cambios de temperatura durante el almacenamiento congelado, dañan la estructura del músculo, lo que a su vez provoca alteraciones en las reacciones bioquímicas que se producen a nivel celular e influyen en los parámetros de calidad física de la carne (2, 4, 5, 18). Esas alteraciones, incluyendo la desnaturalización de las proteínas miofibrilares, están asociadas a la pérdida de propiedades nutricionales, sensoriales y funcionales de la carne, incluyendo gelificación, emulsificación, viscosidad, solubilidad y capacidad de retención de agua (3, 6, 7, 28).

Las proteínas miofibrilares incluyen proteínas contráctiles como miosina y actina, proteínas reguladoras como tropomiosina y troponina y otras proteínas menores (26). Estas son en gran parte responsables de las propiedades funcionales de la carne, especialmente la miosina (23, 24, 27) y son propensas a la desnaturalización durante el almacenamiento congelado a largo plazo (8, 22)**.** Los cambios que se producen en el músculo de pescado durante el almacenamiento congelado pueden minimizarse utilizando aditivos crioprotectores apropiados (10), pues pueden proteger el tejido del daño por congelamiento al mitigar el crecimiento de cristales de hielo (11). Se sabe que los crioprotectores como carbohidratos y polioles reducen la desnaturalización de la proteína miofibrilar durante el almacenamiento congelado, manteniendo las propiedades funcionales en la carne (3, 12).

El yamú (*Brycon amazonicus)* es la especie más común entre los bryconidos, nativa de los Llanos Orientales colombianos, y la más explorada para piscicultura dado su hábito alimenticio omnívoro, su rápido crecimiento y eficiencia alimenticia, óptimo sabor de su carne y sus especiales características para la pesca deportiva (13). El músculo de yamú es altamente susceptible a la pérdida de calidad inducida durante el almacenamiento congelado, sin embargo, aún no existen reportes científicos sobre el efecto crioprotector del sorbitol en la carne de este pescado. Así, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto crioprotector del sorbitol incorporado al músculo de yamú, sometido a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

2.3 Metodología

2.3.1 Material biológico

Los ejemplares de yamú (*Brycon amazonicus*) fueron obtenidos de una finca de producción piscícola ubicada en el Municipio de Lejanías, Departamento del Meta, localizado entre los 04º54'25'' y los 01º36'52'' de latitud norte, y los 71º4'38'' y 74º53'57'' de longitud oeste, con una temperatura promedio de 24°C en la llanura. Se utilizaron 24 ejemplares clínicamente sanos de 500 g de peso vivo y talla total media de 43 cm. Los peces se sacrificaron por choque térmico en agua con hielo (0 ± 2°C), se evisceraron y enviaron inmediatamente al Laboratorio de análisis y control de calidad de carnes, pescados y derivados del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia. Durante el transporte los ejemplares se mantuvieron empacados en bolsas plásticas bajo refrigeración a 4°C en neveras de poliestireno expandido con hielo durante 4 horas. Al llegar al laboratorio los ejemplares se lavaron con agua fría (5 ± 1,5°C) y posteriormente se procedió a retirar dos filetes de cada uno.

2.3.2 Tratamientos experimentales y preparación de muestras

Los filetes se almacenaron a 2 ± 2°C o -18 ± 2°C, durante 24 o 48 horas junto con la inyección solución de sorbitol al 60% (Sorbitol USP 70%, Ciacomeq S.A.S) hasta lograr una absorción del 5% p/p, para un total de 8 tratamientos con 3 repeticiones para cada uno, el diseño experimental puede ser observado en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8
INCLUSION DE SORBITOL	sin sorbitol	con sorbitol	sin sorbitol	con sorbitol	sin sorbitol	con sorbitol	sin sorbitol	con sorbitol
TEMPERATURA	2 ± 2°C		-18 ± 2°C		2 ± 2°C		-18 ± 2°C	
TIEMPO	24 HORAS				48 HORAS			

2.3.3 Análisis de textura

Esta característica se evaluó mediante un test de compresión (65), utilizando un texturómetro electrónico modelo Stable Micro System texture analyser (TA.XT2, Surrey,

England). Todas las pruebas se realizaron a temperatura de refrigeración (4°C), utilizando como muestra de cada filete tres cubos de 2 cm × 2 cm × 1 cm. Las velocidades del test fueron: antes de la prueba: 1,00 mm/s, durante la prueba: 1,10 mm/s y después de la prueba: 10,00 mm/s. La distancia entre el cilindro y la muestra de 15,0 mm y la compresión de la muestra 40,0 %.

2.3.4 Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) de las muestras cárnicas de yamú se realizó siguiendo la metodología propuesta por Sánchez-Alonso et al (66), en la cual se tomaron 3 gramos de la muestra y se envolvieron en papel filtro (2 papeles filtro Whatman No. 1, de 110 mm de diámetro) previamente pesados; posteriormente se introdujeron en un tubo Falcon, y se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 *g*. Después del centrifugado, se retiraron cuidadosamente los papeles y se pesaron. La CRA se expresó como porcentaje de agua retenida por la muestra después de la centrifugación.

2.3.5 Medición de pH

El pH de la suspensión resultante fue medido con un pH metro calibrado después de homogenizar 10 gramos de muestra con 100 mL de agua destilada, según la metodología descrita por Mohan et al (67).

2.3.6 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras para este procedimiento se fijaron en formol buferado al 4%, posteriormente se secaron a punto crítico utilizando el equipo EK 3150 durante 15 minutos y luego se metalizaron con oro utilizando un equipo Quorum, Q150R ES, para proceder a la observación con microscopio SEM (FEI, Quanta 200 –r). Las muestras de filete se montaron en soportes individuales. Las imágenes obtenidas se captaron con magnitudes de 200X, 1000X y 4000X (37).

2.3.7 Microscopía óptica

Las muestras fueron fijadas en formol buferado al 4% y embebidas en parafina. Las placas con la muestra extendida fueron teñidas con tricrómico de Masson, con el fin de resaltar las fibras de colágeno. Para este proceso, inicialmente se lavaron con agua destilada y

posteriormente se sumergieron en Hematoxilina de Weigert durante 5 minutos; después se lavaron con agua destilada y se sumergieron en Fucsina de Ponceau durante 5 minutos. Luego se sumergieron en ácido fosfomolíbdico por 5 min y se pasaron a una solución azul de anilina durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se analizaron con un microscopio Leica DM750 P (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) y se tomaron imágenes con diferentes acercamientos (4X, 10X y 40X) (37).

2.3.8 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó aplicando modificaciones al método propuesto por Cao et al (68). Un gramo de muestra se homogenizó en un equipo homogeneizador Ultra-turrax® IKA T-25, USA con 4 volúmenes de agua destilada-desionizada durante 30 s; luego se centrifugó a 5000 *g* y 4°C durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,5 durante 30 s. Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 5000 *g* y 4°C por 5 min; el precipitado se suspendió en 4 volúmenes de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,5 frío y se repitió el proceso de centrifugado 2 veces más, se descartó el sobrenadante y después se realizó un último centrifugado a 3000 g por 15 minutos y se diluyó el precipitado con buffer fosfato 50mM y 500 mM de NaCl pH 8.0. A cada uno de los extractos de proteínas se le agregaron 5 µl iodacetamida 100 mM y 25 µl de EDTA 50 mM como inhibidores enzimaticos.

2.3.9 Cuantificación de proteínas

Se realizó una cuantificación de cada extracto proteico con el fin de estandarizar la cantidad de proteína en cada muestra. La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó siguiendo el método del ácido bicinconínico (BCA), por medio de un Kit de determinación de proteínas Pierce ™ BCA® Thermo Scientific para conteo total de proteínas. Este método combina la reducción por parte de la proteína de los cationes cúpricos ($Cu+^{2}$) a cuprosos ($Cu+^{1}$) en un medio alcalino y la reacción de color verde a púrpura por la quelación de las moléculas de BCA con los iones cuprosos. Este complejo soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es casi lineal con el aumento de las concentraciones de proteína en un rango de 20 a 2000 µg / ml (69).

2.3.10 Perfiles de movilidad electroforetica por SDS-PAGE

Para la identificación de los perfiles de proteínas miofibrilares de la carne de yamú, se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida con un sistema de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad, 25 USA). El gel de separación fue del 7%, el gel de concentración del 5% (p/v) y el buffer de corrido utilizado fue Tris-glicina pH 8,3. Se sembraron 30 µg de proteína total de los extractos proteicos obtenidos de cada muestra. La separación se realizó a un voltaje constante de 120 V para el gel de concentración y 100 V para el gel de resolución. Se empleó un patrón de peso molecular de 12 a 225 kDa y la tinción se realizó con Azul coomassie coloidal G-250 (CBB), el cual se preparó diluyendo 125 g de CBB en 125 mL de isopropanol; posteriormente se le agregaron 50 mL de ácido acético glacial y se completó un volumen de 500 mL con agua destilada desionizada (70).

2.3.11 Análisis Estadístico

Inicialmente se realizó un análisis descriptivo por tratamiento a los datos obtenidos para textura, capacidad de retención de agua y pH, para explorar medidas de tendencia central, dispersión y observaciones atípicas en los datos. Los ochos tratamientos fueron analizados de acuerdo a un diseño completamente al azar en arreglo factorial 2^3, donde los factores fueron temperatura de almacenamiento, tiempo y uso de sorbitol. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza para determinar si existió o no diferencia entre los niveles de cada uno de los factores. Cuando se encontró diferencia entre los niveles de los factores se realizó un test de Tukey con el fin de encontrar cuál de los tratamientos tuvo diferencia significativa. Adicionalmente se realizó un análisis de varianza para cada respuesta con el fin de establecer la diferencia e interacción entre factores. Se evaluaron supuestos de normalidad de residuos (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett). En presencia de interacción se construyeron los gráficos de interacción para poder concluir sobre los mejores tratamientos,

se utilizó el programa R Studio 1.1.383 ® (2017).

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Análisis de textura

La textura es uno de los parámetros de calidad más importantes en la carne de pescado, y puede variar dependiendo de la especie, área muscular, almacenamiento y procesamiento (71). Los cambios de textura durante el almacenamiento congelado pueden afectar las propiedades sensoriales y funcionales del pescado. Los resultados del análisis de textura son presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Textura de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Letras diferentes obtuvieron diferencia estadísticamente significativa (P < 0,05) entre tratamientos.

TIEMPO	TEMPERATURA	SORBITOL	TEXTURA
24 HORAS	2 ± 2°C	T1 SIN SORBITOL	1545,09 ± 363,14 ^{cd}
		T2 CON SORBITOL	1613,21 ± 487,73 ^{cd}
	-18 ± 2°C	T3 SIN SORBITOL	1801,94 ± 336,6 ^{c}
		T4 CON SORBITOL	2432,71 ± 411,1 ^{a}
48 HORAS	2 ± 2°C	T5 SIN SORBITOL	1720,26 ± 157,38 ^{c}
		T6 CON SORBITOL	1849,56 ± 390,37 ^{bc}
	-18 ± 2°C	T7 SIN SORBITOL	1143,85 ± 344,17 ^{d}
		T8 CON SORBITOL	2356,87 ± 249,03 ^{ab}

La figura 1 muestra la variación de la fuerza de compresion de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (P-valor = 0.7437 para la prueba de Shaphiro-Wilk y P-valor = 0.1705 para la prueba de Bartlett). El análisis de varianza realizado para los parámetros de textura obtenidos evidencia que hubo diferencia significativa entre tratamientos (P < 0,05). La prueba de Tukey muestra que el tratamiento sometido durante 24 horas a -18 ± 2°C con la incorporación de sorbitol (T4) obtuvo el mayor valor de fuerza de compresión, siendo estadísticamente similar al tratamiento sometido durante 48 horas a -18 ± 2°C con la incorporación de sorbitol (T8) que disminuyó un 3,1% (respecto a T4).

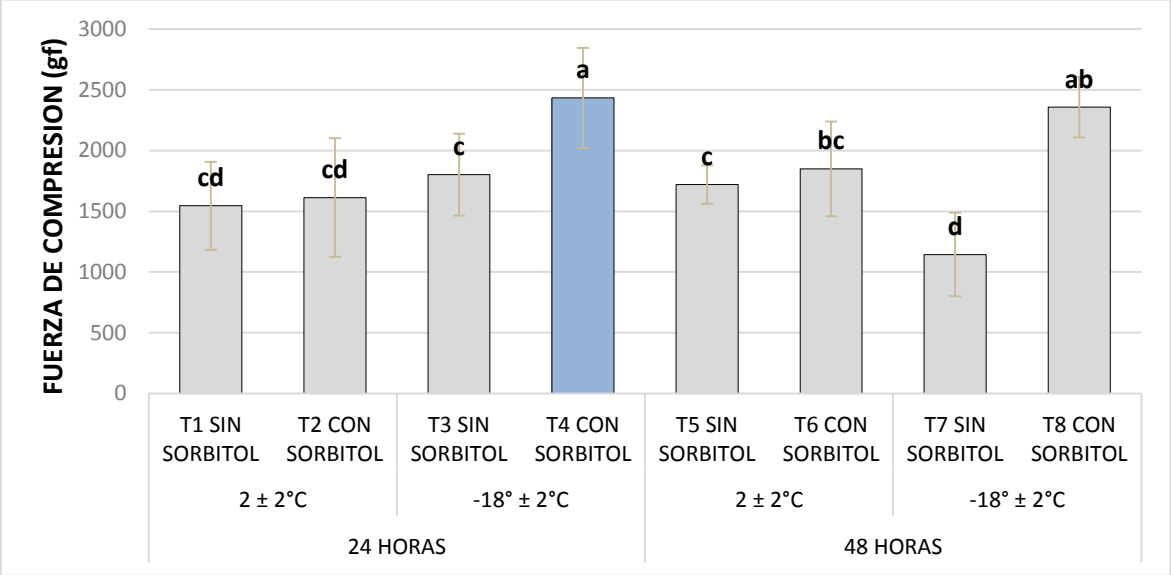

Figura 1. Variacion de la fuerza de compresion de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.
Las barras de error corresponden a la desviación estándar y letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa.

La figura 2 muestra el efecto de la Interacción entre la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable textura. La textura de la carne de yamú tuvo diferencia significativa por la incorporación de sorbitol y el tiempo de almacenamiento por separado ($P < 0,05$) y a su vez tuvo diferencia significativa por la interacción entre la incorporación del sorbitol con la temperatura de almacenamiento ($P < 0,05$), siendo notable que los valores de textura son mayores cuando la carne se trata con sorbitol y se almacena a temperatura de -18°C, independientemente del tiempo que ésta permaneció almacenada, debido a que el crioprotector actúa únicamente a temperatura de congelación, impidiendo la formación de cristales de hielo intra o intercelulares que puedan afectar la textura. La interacción ($P < 0,05$) de la incorporación de sorbitol con el tiempo de almacenamiento permite observar que la textura de la carne es mayor en todos los casos en que se incorpora sorbitol a la carne, especialmente cuando se compara con la carne que se almaceno durante 48 horas sin la incorporación del crioportector.

(1) Temperatura vs sorbitol **(2)** temperatura vs tiempo **(3)** tiempo vs sorbitol.

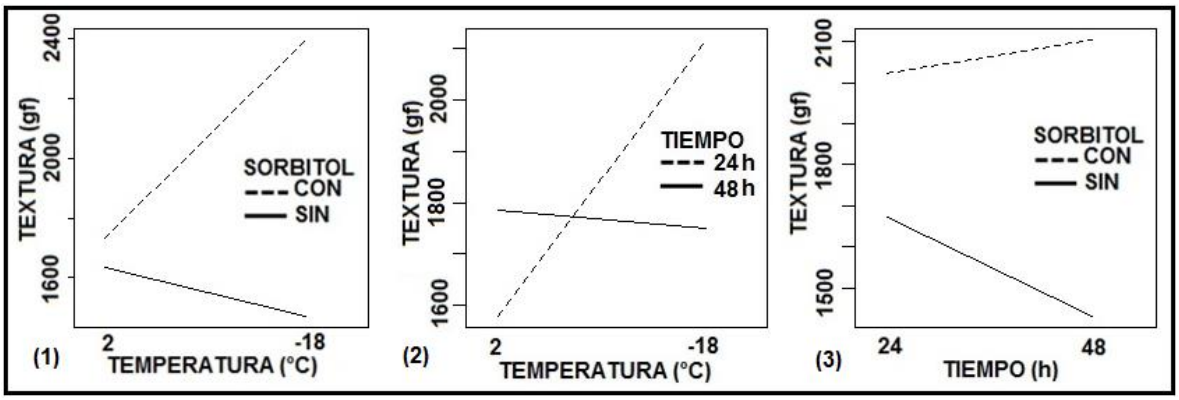

Figura 2. Efecto de la Interacción entre la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable textura.

La presencia de interacción (P < 0,05) entre temperatura y tiempo de almacenamiento indican que la temperatura de congelación mantiene una mayor textura en la carne durante las primeras 24 horas de almacenamiento, respecto a la disminución de la textura observada a las 48 horas de almacenamiento congelado, independientemente del uso o no de sorbitol. El efecto del sorbitol no es visible cuando la carne se almacena a temperatura de 2°C independientemente del tiempo de almacenamiento (T2: 24 horas a 2 °C con sorbitol y T6: 48 horas a 2 °C con sorbitol). Además, se obtuvo una pérdida importante de textura en los tratamientos que no utilizaron la incorporación de sorbitol a temperatura de 2°C (T1: 24 horas a 2 °C sin sorbitol y T5: 48 horas a 2 °C sin sorbitol) y de igual manera a -18°C (T3: 24 horas a -18°C sin sorbitol) y con una pérdida aun mayor cuando la carne fue almacenada durante 48 horas (T7: 48 horas a -18°C sin sorbitol). Sin embargo, cuando la incorporación de sorbitol se utilizó a temperatura de -18°C (T4: 24 horas a -18°C con sorbitol) se obtuvo una mayor fuerza de compresión respecto a los demás tratamientos, aunque esta se ve disminuida a las 48 horas de almacenamiento (T8: 48 horas a -18°C con sorbitol).

Los resultados obtenidos en el test de compresión muestran valores mayores en todos los tratamientos a los reportados para filetes de la misma especie, almacenados a -8°C durante 61 horas (37) y para matrinxã (*Brycon cephalus) almacenado* a -3°C por 12 horas (31), lo cual puede estar influenciado por el tiempo transcurrido desde su sacrificio hasta su almacenamiento, el tiempo de almacenamiento, y el tratamiento con sorbitol. Sin embargo, los datos son similares a los reportados para merluza roja (*Urophycis chuss)* tratado con la incorporación de sorbitol y tripolifosfato de sodio (1600 gf) (63).

La pérdida de textura es evidente cuando la carne es sometida a -18°C sin la incorporación de sorbitol debido a daños generados por la formación de cristales de hielo intra e inter celulares que dañan la estructura muscular (18, 47, 61), siendo mayor el daño a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, la incorporación de sorbitol en la carne es efectiva cuando ésta se almacena a temperatura de -18°C, obteniendo así valores de fuerza de compresión por encima de los demás tratamientos, con resultados similares a los obtenidos en filetes de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss)* inmersos en una solución al 8% de sorbitol y sacarosa y almacenados a -20°C (29).

2.4.2 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retenención de agua del músculo se considera un esencial parámetro de calidad y una mayor capacidad de retencion de agua es de gran importancia tanto para la industria como para el consumidor final (72). Los resultados de la capacidad de retencion de agua pueden ser observadas en la tabla 3.

Tabla 3. Capacidad de retención de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Letras diferentes obtuvieron diferencia estadísticamente significativa (P < 0,05) entre tratamientos.

TIEMPO	TEMPERATURA	SORBITOL	RESPUESTA
24 HORAS	2 ± 2°C	T1 SIN SORBITOL	70,4 ± 1,75 ^{a}
		T2 CON SORBITOL	66,3 ± 0,86 ^{bc}
	-18° ± 2°C	T3 SIN SORBITOL	63,05 ± 1,87 ^{de}
		T4 CON SORBITOL	66,47 ± 0,98 ^{b}
48 HORAS	2 ± 2°C	T5 SIN SORBITOL	65,7 ± 1,35 ^{bcd}
		T6 CON SORBITOL	63,46 ± 1,13 ^{cde}
	-18° ± 2°C	T7 SIN SORBITOL	62,01 ± 1,08 ^{e}
		T8 CON SORBITOL	66,92 ± 0,28 ^{b}

La figura 3 muestra la variación de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (P-valor = 0.1071 para la prueba de Shaphiro-Wilk y P-valor = 0.3028 para la prueba de Bartlett). El análisis de varianza realizado para los parámetros de capacidad de retención de agua obtenidos evidencia que hubo diferencia significativa entre tratamientos (P < 0,05). La prueba de Tukey muestra que el tratamiento sometido durante 24 horas a 2°C sin la incorporación de sorbitol (T1) obtuvo la mayor capacidad de retención

de agua, mientras que la menor capacidad de retención de agua obtenida fue la del tratamiento sometido durante 48 horas a 18°C sin la incorporación de sorbitol (T7), siendo estadísticamente similar a los tratamientos T3 (24 horas a -18°C sin sorbitol) y T5 (48 horas a 2 °C sin sorbitol).

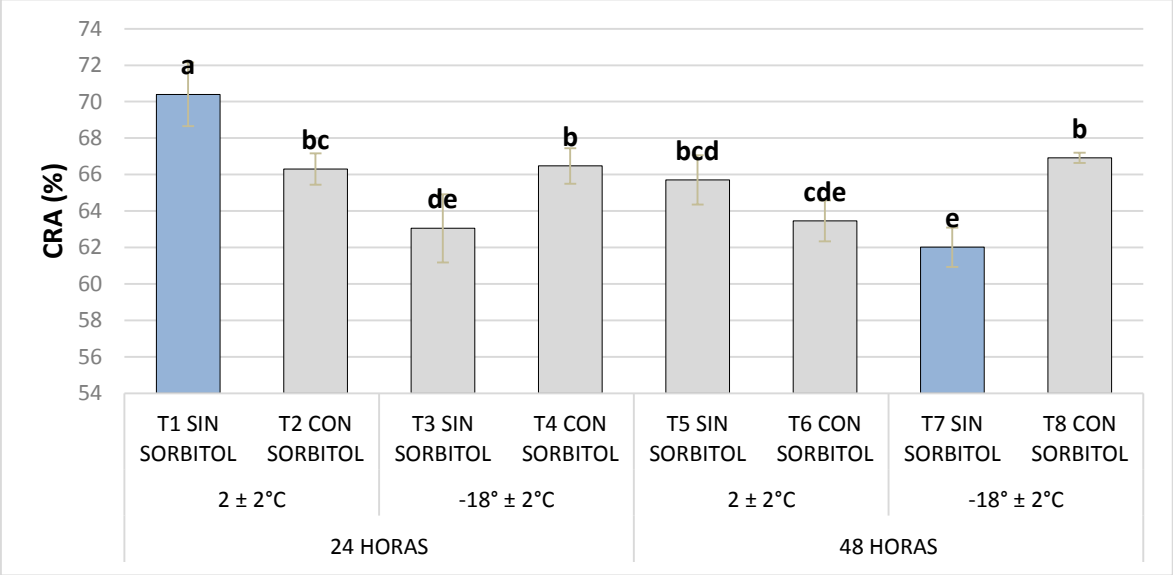

Figura 3. Variacion de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar y letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa.

La figura 2 muestra el efecto de la Interacción entre la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable capacidad de retencion de agua. Estos valores fueron afectados por la temperatura y el tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$), presentando además un efecto significativo ($P < 0,05$) por la interacción entre la incorporación del sorbitol con la temperatura de almacenamiento debido a que la CRA es menor cuando la carne se almacena a -18°C sin la incorporación del crioprotector, mientras que dicha característica se mantiene cuando la carne se trata con sorbitol. La interacción entre la temperatura con el tiempo de almacenamiento ($P < 0,05$) muestra que independientemente de la temperatura de almacenamiento, la CRA disminuye al cabo de 48 horas para todos los tratamientos, especialmente para aquellos que no fueron tratados con sorbitol.

(1) Temperatura vs sorbitol **(2)** temperatura vs tiempo **(3)** tiempo vs sorbitol.

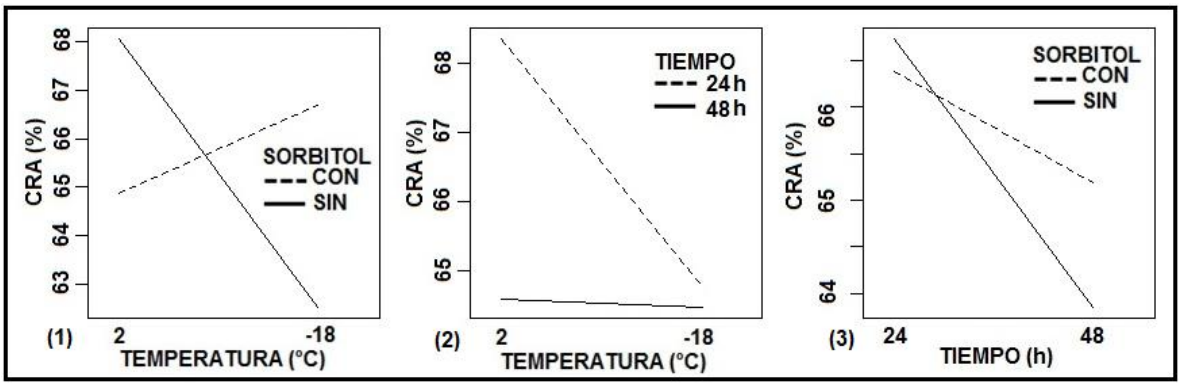

Figura 4. Efecto de la Interacción entre la incorporacion o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable capacidad de retencion de agua.

La mayor capacidad de retención de agua se obtuvo cuando se almacenó la carne a 2°C durante 24 horas sin sorbitol (70.4% para T1) con una importante pérdida de CRA a las 48 horas de almacenamiento a 2°C sin sorbitol (65.7% para T5). La menor CRA se obtuvo en los tratamientos que fueron almacenados a -18°C sin la incorporación de sorbitol durante 24 y 48 horas (63.05 y 62.01% para T3 y T7 respectivamente). Los tratamientos que utilizaron la incorporación de sorbitol almacenados a 2°C durante 24 y 48 horas muestran una baja en la capacidad de retención de agua (66.30 a 63.46% para T2 y T6 respectivamente), mientras que la incorporación de sorbitol a -18°C durante 24 y 48 horas muestra una capacidad de retención de agua mayor (66.47 a 66.92% para T4 y T8 respectivamente) que aquellos tratamientos que no tuvieron la incorporación de sorbitol.

La capacidad de retención de agua sufrió una importante reducción en todos los tratamientos, siendo aún mayor en los que no tuvieron la inclusión de sorbitol, explicado por la inyección del 5 % (p/p) de la solución de sorbitol que aumentó la humedad de los filetes tratados. Esta reducción en la capacidad de retención de agua se da por la pérdida de funcionalidad de las membranas celulares, que sufren daños irreversibles durante la congelación, perdiendo su capacidad de rehidratación por pérdida de componentes lipídicos (42) y la desnaturalización de proteínas miofibrilares como actina y miosina (6, 7). Los resultados de capacidad de retención de agua están relacionados con los resultados obtenidos en el test de compresión, donde los tratamientos que mantuvieron los valores para CRA durante las 48 horas de refrigeración fueron los mismos sometidos a -18°C con la incorporación de sorbitol y que obtuvieron los mayores valores de fuerza de compresión al cabo de 24 y 48 horas de almacenamiento (figura 1).

2.4.3 pH

Los valores obtenidos para pH pueden ser observados en la tabla 4.

Tabla 4. pH de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

TIEMPO	TEMPERATURA	SORBITOL	pH
24 HORAS	2 ± 2°C	T1 SIN SORBITOL	6,01 ± 0,01 [c]
		T2 CON SORBITOL	6,17 ± 0,02 [a]
	-18° ± 2°C	T3 SIN SORBITOL	5,95 ± 0,01 [de]
		T4 CON SORBITOL	6 ± 0,02 [cd]
48 HORAS	2 ± 2°C	T5 SIN SORBITOL	5,98 ± 0,02 [cd]
		T6 CON SORBITOL	6,08 ± 0,005 [b]
	-18° ± 2°C	T7 SIN SORBITOL	5,93 ± 0,01 [e]
		T8 CON SORBITOL	6 ± 0,01 [c]

Se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (P-valor = 0.4002 para la prueba de Shaphiro-Wilk y P-valor = 0.8251 para la prueba de Bartlett). El análisis de varianza realizado para los parámetros de capacidad de retención de agua obtenidos evidencia que hubo diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0,05$).

La figura 5 muestra la variación de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. La prueba de Tukey muestra que el tratamiento sometido a 2°C durante 24 horas con la incorporación de sorbitol obtuvo el pH más alto (6,17 para T2), seguido el tratamiento sometido a 2°C durante 48 horas con la incorporación de sorbitol (6,08 paraT6). El tratamiento sometido a -18°C durante 48 horas sin la incorporación de sorbitol (5,93 para T7) fue el que obtuvo el pH más bajo, que a su vez presento similitud estadística con el tratamiento sometido a -18°C durante 24 horas sin la incorporación de sorbitol (5,95 para T3).

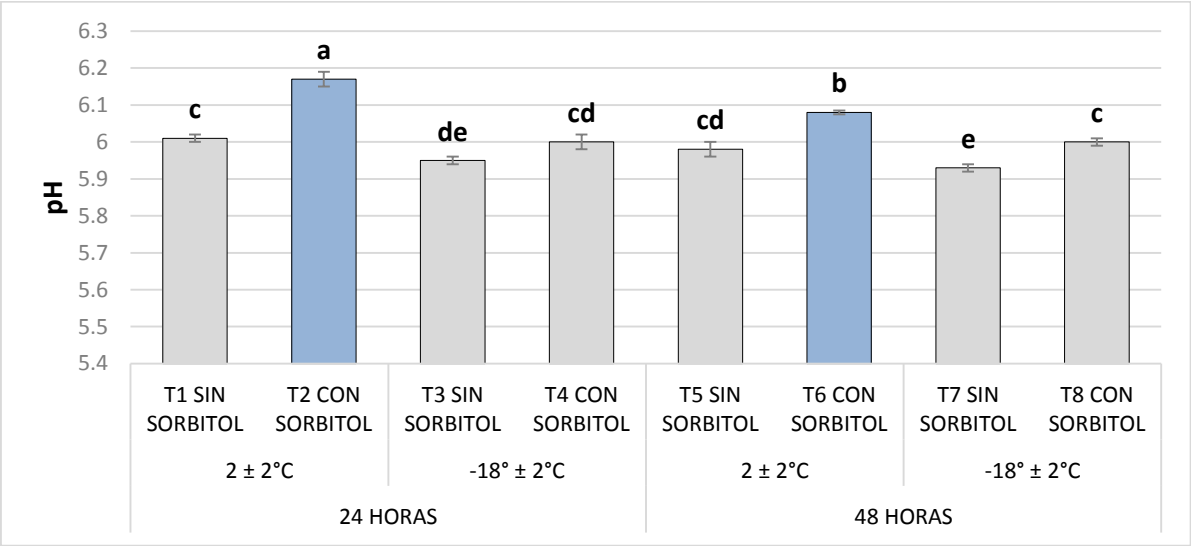

Figura 5. Variacion de la capacidad de retencion de agua de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar y letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa.

La figura 6 muestra el efecto de la Interacción entre la incorporacion o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable Ph. Se evidenció un pH más bajo para los tratamientos sin la incorporación de sorbitol a 2°C y -18°C a lo largo de 24 horas de almacenamiento (6.01 y 5.95 para T1 y T3 respectivamente) el cual disminuye a las 48 horas de almacenamiento (5.98 y 5.93 para T5 y T7 respectivamente). Los valores de pH más alto se presentaron en el tratamiento con la incorporación de sorbitol a 2 °C almacenado por 24 horas (6.17 para T2), sin embargo, se presentó la misma disminución en el pH al cabo de 48 horas de almacenamiento (6.08 para T6). El pH para el tratamiento almacenado a -18°C con la incorporación de sorbitol, fue de 6.00, el cual se mantuvo igual durante el almacenamiento por 48 horas (T8).

(1) Temperatura vs sorbitol **(2)** temperatura vs tiempo **(3)** tiempo vs sorbitol.

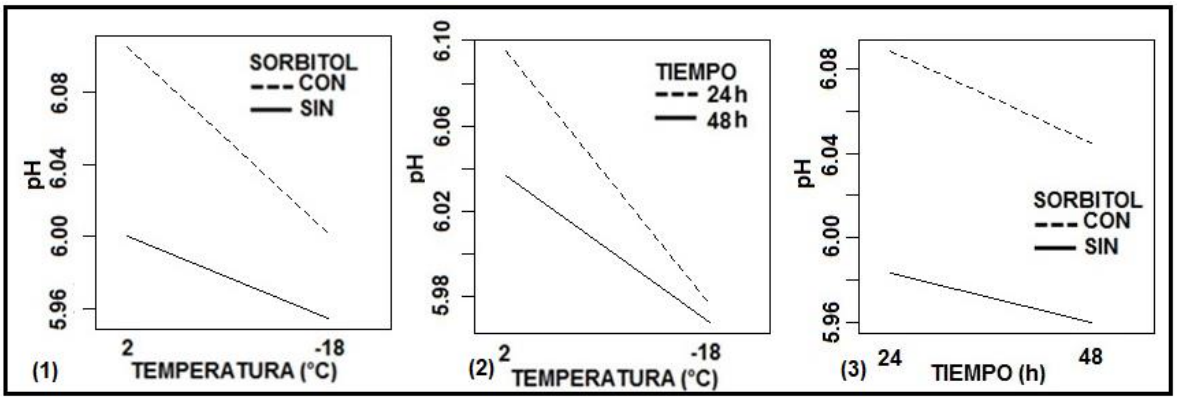

Figura 6. Efecto de la Interacción entre la incorporacion o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento de carne de yamú (*Brycon amazonicus*) sobre la variable pH.

El pH es mayor cuando se incorpora sorbitol a la carne de yamú, independientemente del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en ausencia de sorbitol, el almacenamiento a -18°C genera una reducción del pH, especialmente cuando este se prolonga por 48 horas. El descenso del pH durante el almacenamiento indica la transformación de glucógeno muscular en ácido láctico durante la etapa post mortem (73). De igual manera, un pH bajo está directamente relacionado con la perdida de textura (74, 75), debido al debilitamiento del tejido conectivo y la desnaturalización proteica (76). El pH se mantiene estable durante el almacenamiento por 48 horas cuando se incorpora sorbitol en la carne sometida a -18°C.

2.4.4 Microscopia electrónica de barrido

Las imágenes obtenidas por medio de microscopia electrónica de barrido son presentadas en la figura 7. Los tratamientos almacenados durante 24 horas a 2°C con o sin la incorporación de sorbitol (T1: 2°C durante 24 horas sin sorbitol y T2: 2°C durante 24 horas con sorbitol) permiten observar la estructura miofibrilar en estado integro sin la separación de los miotomos, mientras que la separación de los mismos es observada en los tratamientos almacenados durante 24 horas a -18°C (T3: y T4). Además, se evidenció la afectación en la organización de las fibras musculares en tratamientos almacenados a 2°C por 48 horas (T5 y T6). Para el tratamiento almacenado durante 48 horas a -18°C (T7) se evidenció una mayor separación entre miotomos y separación de las miofibrillas que para el tratamiento que tuvo la incorporación con sorbitol (T8), donde no fue tan evidente la separación de las miofibrillas a pesar de que esta no fue medida.

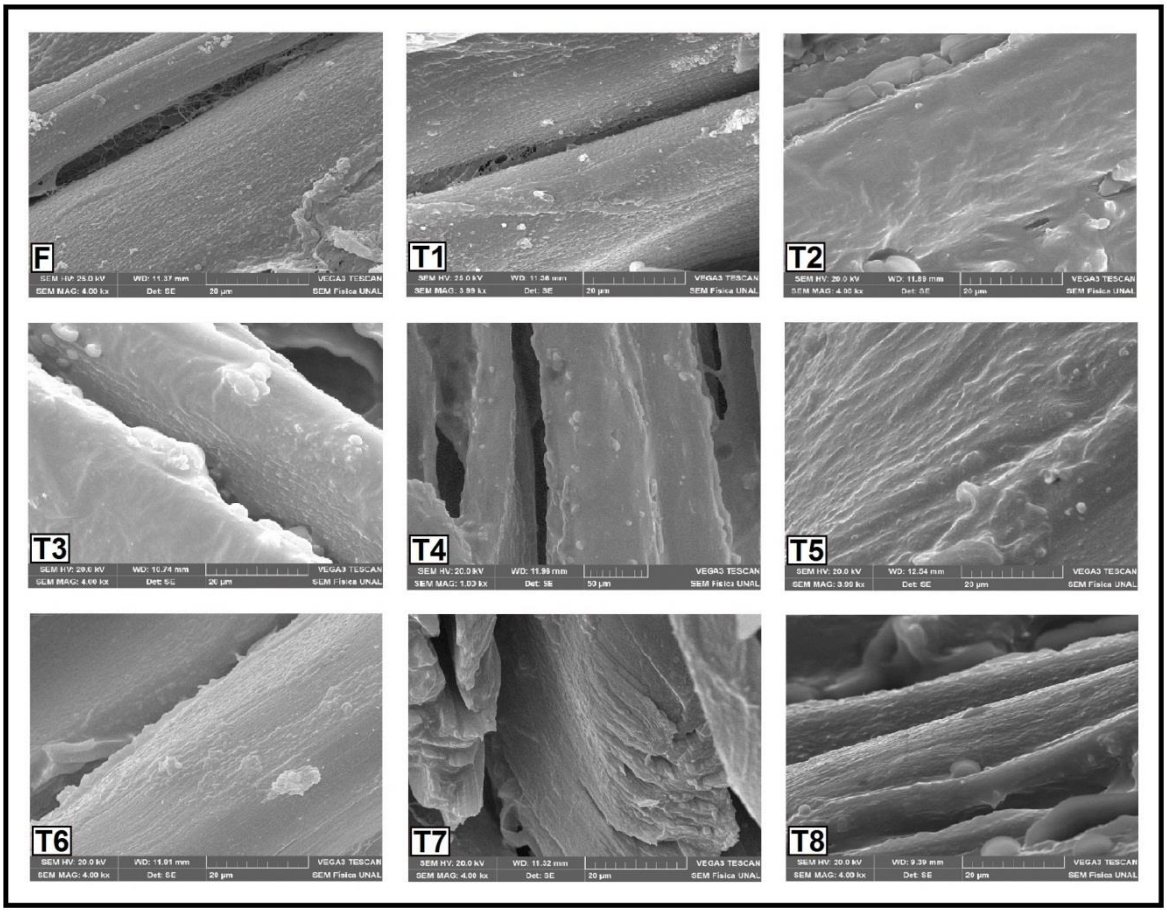

Figura 7. Imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. F: filete fresco; T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas.

2.4.5 Microscopia óptica

Las imágenes obtenidas por medio de microscopia óptica se presentan en la figura 5. Los cortes transversales de las fibras musculares muestran separación del endomisio en tratamientos almacenados durante 24 o 48 horas a 2°C no tratados con sorbitol (T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas y T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas), mientras que los tratamientos con incorporación de sorbitol bajo las mismas condiciones no presentaron dicha separación (T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas y T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas). La estructura del endomisio se vio afectada en áreas de mayor tamaño en tratamientos sometidos a -18°C y no tratados con sorbitol independientemente del tiempo de almacenamiento (T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas y T7: -18°C sin sorbitol durante

48 horas) además de la presencia de separaciones interfibrilares. Los tratamientos sometidos a -18°C con incorporación de sorbitol presentaron una menor separación del endomisio y de espacios interfibrilares (T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas), aunque levemente mayor para cuando el almacenamiento se prolongó durante 48 horas (T8 -18°C con sorbitol durante 48 horas).

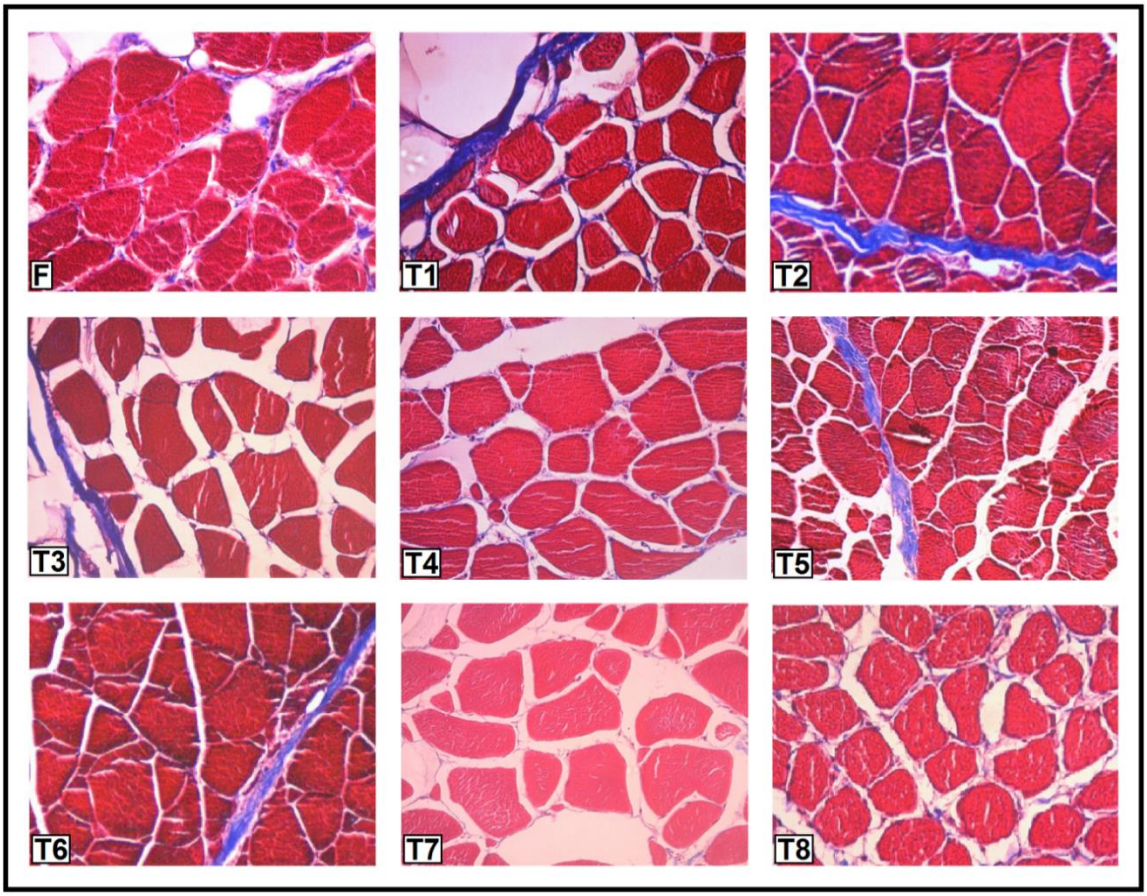

Figura 8. Imágenes de microscopia óptica de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. F: filete fresco; T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas.

Los resultados obtenidos por medio del análisis con microscopia óptica y electrónica de barrido muestran la degradación del tejido conectivo a causa del almacenamiento a bajas temperaturas, especialmente a -18°C donde es evidente la perdida de tejido interfibrilar, espacios en la miocomata y la separación entre miotomas, además de desprendimiento del

endomisio ya reportado para otras especies (medregal del Japón *(Seriola quinqueradiata)*, dorada del Japón *(Pagrus major) y* jurel *(Pseudocaranx dentex)* (9) independientemente del tiempo de almacenamiento (Figura 4 y 5). Resultados similares son reportados para filetes obtenidos de la misma especie y almacenados a temperatura de -8°C (37) e indican la degradación del colágeno a causa del almacenamiento a bajas temperaturas; lo anterior también ha sido reportado para diversas especies (9, 34, 35, 36, 65). La formación de cristales de hielo durante la congelación afecta la ultraestructura del músculo de los peces, lo que a su vez provoca alteraciones en las reacciones bioquímicas que se producen a nivel celular e influyen en los parámetros de calidad física de la carne (18). Sin embargo, la estructura muscular se mantuvo en un estado más íntegro cuando la carne fue tratada en las mismas condiciones y con la incorporación de sorbitol, encontrando menor separación entre miotomas y mayor integridad del tejido interfibrilar.

2.4.6 Perfiles de movilidad electroforetica por SDS-PAGE

El perfil proteico obtenido puede ser observado en la figura 6. Se detectaron hasta 14 bandas en la electroforesis en gel de poliacrilamida. Las bandas con mayor peso molecular (243.54 y 220.93 kDa) se encontraron en todos los tratamientos, con una mayor intensidad en tratamientos almacenados durante 48 horas (T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas y T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas). Además, se encontraron bandas con menor peso molecular (156.08 kDa, 104.39 kDa, 99.43 kDa, 79.09 kDa, 76.72 kDa, 71.31 kDa, 67.51 kDa, 60.93 kDa y 57.68 kDa) en todos los tratamientos especialmente en aquellos sometidos a -18°C (T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas y T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas) y con una intensidad ligeramente mayor en los tratamientos sometidos a -18°C durante 48 horas (T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas y T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas). Se presentaron bandas con peso molecular de 45.76 y 43.96 kDa con baja intensidad para tratamientos almacenado durante 24 horas a 2°C (T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas y T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas). Las mismas bandas ligeramente más intensas para los tratamientos almacenados 24 horas a -18°C (T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas y T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas) y una intensidad mucho mayor para los tratamientos almacenados a 2 y – 18°C y con la incorporación de sorbitol (T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas y T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas) o sin la incorporación de este mismo (T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas).

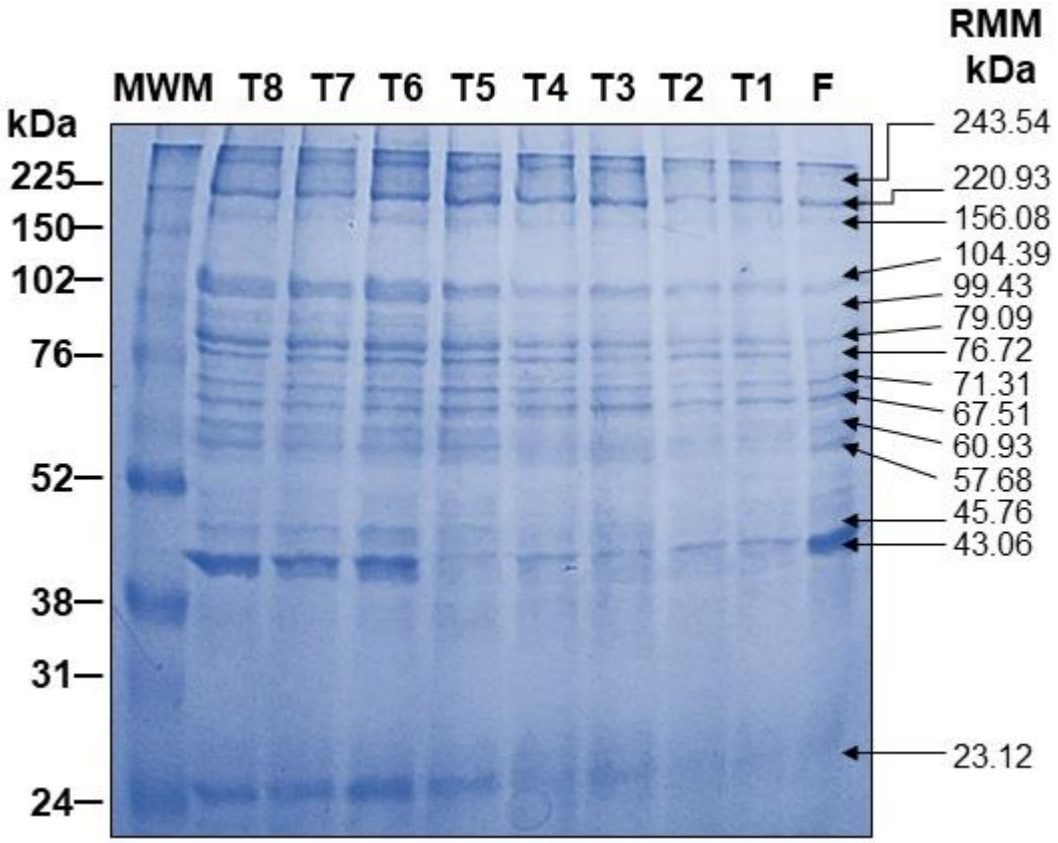

Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en gel del 7 % de acrilamida de extractos proteicos de la carne de yamú (*Brycon amazonicus*), sometida a la incorporación o no de sorbitol a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Línea F: carne fresca; línea T1: 2°C sin sorbitol durante 24 horas; línea T2: 2°C con sorbitol durante 24 horas; línea T3: -18°C sin sorbitol durante 24 horas; línea T4: -18°C con sorbitol durante 24 horas; línea T5: 2°C sin sorbitol durante 48 horas; línea T6: 2°C con sorbitol durante 48 horas; línea T7: -18°C sin sorbitol durante 48 horas; línea T8: -18°C con sorbitol durante 48 horas; línea MWM: patrón de peso molecular; RMM: masa molecular relativa.

Las proteínas miofibrilares incluyen proteínas contráctiles como miosina y actina, proteínas reguladoras como la troponina, y otras proteínas menores (26). El peso molecular de algunas proteínas presentes en la carne de pescado ha sido reportado por otros autores, como la miosina de cadena larga 200 kDa (77), α- actina 105 kDa, troponina 78 kDa (78) y actina 45 kDa (68). Bandas con pesos moleculares similares se pueden observar en todos los tratamientos y con mayor intensidad en tratamientos almacenados por 48 horas (T5, T6, T7 y T8 Fig. 6) donde se mantuvieron las bandas con pesos similares a miosina de cadena pesada (220.93 kDa), α- actina (104.39 kDa), troponina (79.09 kDa) y actina (45.76 y 43.06 kDa). Por otro lado, también se encontraron bandas con peso molecular mayor (243.54

kDa) y menor (156.08, 99.43, 76.72 y 23.12 kDa) que no están presentes en la línea correspondiente al perfil proteico de la carne fresca analizada (F), y que tienen mayor intensidad a las 48 horas de almacenamiento a 2°C y -18°C con la incorporación o no de sorbitol (T5, T6 y T7). Se puede inferir que dichas bandas son agregados proteicos o fragmentos de proteínas miofibrilares parcialmente degradadas como la miosina y la actina, que son en gran parte responsables de las propiedades funcionales de la carne durante el almacenamiento refrigerado o congelado (23). La fragmentación o agregación de las proteínas miofibrilares genera pérdidas en su funcionalidad y solubilidad generando ablandamiento (3, 18, 22) siendo este menor en el tratamiento sometido a -18°C durante 24 horas con la incorporación de sorbitol (T4) lo cual indica que el uso de sorbitol a temperatura de congelación reduce la degradación de las proteínas miofibrilares y a su vez ayuda a mantener las propiedades funcionales de la carne a lo largo del almacenamiento congelado.

2.5 Conclusiones

- La carne de yamú sufrió una degradación parcial de sus proteínas miofibrilares como miosina, α- actina y actina, especialmente cuando no fue tratada con sorbitol a temperatura de congelación (-18°C). Adicionalmente se evidenciaron cambios en el tejido conectivo, relacionados con la perdida de textura.

- Las propiedades fisicoquímicas evaluadas en la carne de yamú se vieron afectadas principalmente por la interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento, mientras que la incorporación de sorbitol y la temperatura de almacenamiento tuvieron un efecto significativo sobre la textura de la carne de yamú. La capacidad de retención de agua se vio afectada significativamente por el tiempo y la temperatura de almacenamiento, mientras que el pH de la carne se vio afectado significativamente por los tres factores.

- La capacidad de retención de agua tiene una relación directamente proporcional con la fuerza de compresión de los filetes, siendo esta mayor cuando la textura de la carne se mantiene.

- La utilización de sorbitol a -18°C minimizó los efectos negativos de la congelación sobre las características del musculo de yamú, manteniendo en un estado más integro la microestructura muscular, generando un efecto crioprotector en comparación a la carne no tratada.

Capítulo 3. Bibliografía

1. Gonçalves, A. A., Nielsen, J., & Jessen, F. Quality of frozen fish. Handbook of meat, poultry and seafood quality. In L. M. L. Nollet (Ed.). 2012. pp. 479-509. Ames: John Wiley & Sons, Inc.

2. Benjakul, S., & Visessanguan, W. Impacts of freezing and frozen storage on quality changes of seafoods. Physicochemical aspects of food engineering and processing. In Sakamon Devahastin (Ed.) 2011 (pp. 283–306). CRC Press, Woodhead Publishing Limited.

3. Nikoo, M., Benjakul, S., & Rahmanifarah, K. Hydrolysates from marine sources as cryoprotective substances in seafoods and seafood products. Trends in Food Science & Technology. 2016; 57(Part A), 40–51. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.001

4. Velasco, J., Dobarganes, C., & Martínez-Ruiz, G. Oxidative rancidity in foods and food quality. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. In L. H. Skibsted, J. Risbo, & M. L. Andersen (Eds.). 2010; (pp. 3–32). Woodhead Publishing Limited.

5. Lee, J., Park, H. W., Jenkins, R., Yoon, W. B., & Park, J. W. Image and chemical analyses of freezing-induced aggregates of fish natural actomyosin as affected by various phosphate compounds. Food Bioscience. 2017; 19 (Supplement C), 57–64. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.06.007

6. Andersen, C. M., & Jørgensen, B. On the relation between water pools and water holding capacity in cod muscle. Journal of Aquatic Food Products Technology. 2004; 13, 13–23.

7. Lund, M. N., & Baron, C. P. Protein oxidation in foods and food quality. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. In L. H. Skibsted, J. Risbo, & M. L. Andersen (Eds.). 2010; (pp. 33–69). Woodhead Publishing Limited.

8. Medina, I., & Pazos, M. Oxidation and protection of fish. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. In E. Decker, R. Elias, & D. J. McClements (Eds.). 2010; (pp. 91e120). Cambridge: Woodhead Publishing Limited

9. Shigemura, Y., Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., & Kawai, T. Correlation of type V collagen content with postmortem softening of fish meat during chilled storage. Fisheries science. 2003; 69(4), 842–848. https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00696.x

10. Nikoo, M., & Benjakul, S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant–cryoprotectant: A review. Journal of Functional Foods. 2015; 19(Part A), 753–764. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.014

11. Alvarez, M. D., Fernández, C., & Canet, W. Oscillatory rheological properties of fresh and frozen/thawed mashed potatoes as modified by different cryoprotectants. Food and Bioprocess Technology. 2010; 3(1), 55-70.

12. Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from blacktip shark skin on surimi subjected to different freeze-thaw cycles. LWT - Food Science and Technology. 2012; 47(2), 437–442. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.003

13. Arias JA. Estado actual del conocimiento sobre el yamú, (*Brycon amazonicus)*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2006; 19(2):125–33.

14. Prieto, M., Mouwen, J. M., López Puente, S., & Cerdeño Sánchez, A. Concepto de calidad en la industria agroalimentaria. Interciencia. 2008; 33(4), 258–264.

15. Gallart-Jornet, L., Rustad, T., Barat, J. M., Fito, P., & Escriche, I. Effect of superchilled storage on the freshness and salting behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. Food Chemistry. 2007; 103, 1268-1281.

16. Duun, A. S., & Rustad, T. Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. Food Chemistry. 2007; 105, 1067-1107.

17. Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T., & Kolsaker, K. Superchilling of food: a review. Journal of Food Engineering. 2011; 107, 141-146.

18. Leygonie, C., Britz, T. J., & Hoffman, L. C. Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. Meat Science. 2012; 91, 93-98.

19. Hunt, A., & Park, J. W. Comparative study of sodium bicarbonate on gelling properties of Alaska pollock surimi prepared at different freezing rates. Journal of Food Quality. 2014; 37(5), 349–360.

20. Ramírez, J. A., Bandman, E., Wick, M., & Martín-Polo, M. O. Monoclonal antibodies as a tool for studying the protein-structure relationship in fish. Ciencia y Tecnologia Alimentaria. 1998; 2(1), 6–11. https://doi.org/10.1080/11358129809487577.

21. Toyoda, K., Kimura, I., Fujita, T., Noguchi, S. F., & Lee, C. M. The surimi manufacturing process. Surimi technology. 1992; 79–112.

22. Goeller, L. M., Amato, P. M., Farkas, B. E., Green, D. P., Lanier, T. C., & Kong, C. S. Optimization of Incorporation of low-molecular-weight cryoprotectants into intact fish

muscle. Journal of Food Science, 69(4). 2004; FEP164-FEP171. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb06342.x

23. Mackie, I. M. The effects of freezing on flesh proteins. Food Reviews International. 1993; 9(4), 575–610. https://doi.org/10.1080/87559129309540979

24. Ramírez, J. A., Santos, I. A., Morales, O. G., Morrissey, M. T., & Vázquez, M. Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2000; 3(1), 21–28. https://doi.org/10.1080/11358120009487644

25. Gökoğlu, N., & Yerlikaya, P. Chemical composition of fish. In N. Gökoğlu, & P. Yerlikaya (Eds.), Seafood chilling, refrigeration and freezing: Science and technology. 2015; 664, 9453 - 23 West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

26. Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods. 2012; 4, 6–24.

27. Watabe, S. Science of processing marine food products. Kanagawa International Fisheries Training Centre. Japan International Cooperation Agency. 1992; 1, 123-141.

28. Jacobsen, C., Nielsen, H. H., Jørgensen, B., & Nielsen, J. Chemical processes responsible for quality deterioration in fish, Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. In L. H. Skibsted, J. Risbo, & M. L. Andersen (Eds.).1992; (pp. 439–465). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

29. Jittinandana, S., Kenney, P. b., & Slider, S. d. Cryoprotection affects physiochemical attributes of rainbow trout fillets. Journal of Food Science. 2003, 68(4), 1208–1214. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09626.x

30. Lee, J., & Park, J. W. Pacific whiting frozen fillets as affected by postharvest processing and storage conditions. Food Chemistry. 2016; 201, 177–184.

31. Suárez, H., Carrasco, P., C, S., Beirão, L. H., de Francisco, A., Nagaky, O., & L, L. Efecto de la súper refrigeración sobre la textura de la carne de matrinxã (*Brycon cephalus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2006; 19(2), 221–227.

32. Adachi, E., & Hayashi, T. In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. Connective Tissue Research. 1986; 14(4), 257–266.

33. Suárez, H. De Francisco, A., Beirão, L. H., Carrasco, S. P., & Rodríguez, M. C. Perdida de textura post mortem de la carne de pescado por almacenamiento en frio. Acta Biológica Colombiana. 2007; 12(1), 3.

34. Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K., & Kawabata, M. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1991; 39(7), 1222–1225.

35. Sato K, Ando M, Kubota S, Origasa K, Kawase H, Toyohara H, et al. Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997;45(2):343–348.

36. Ando M, Toyohara H, Shimizu Y, & Sacaguchi M. Post-mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. Nippon Suisan Gakkaishi. 1991; 57(6), 1165–1169.

37. Castañeda, D., Lozano, J. M., & Suárez, H. (2016). Microstructural changes and the effect on myofibril proteins in yamú (*Brycon amazonicus*) fish meat during cold storage. Agronomía Colombiana, 34(3), 403–414. https://doi.org/https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n3.61316

38. Robb, D. H. F., Kestin, S. C., & Warriss, P. D. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh color and gaping in rainbow trout. Aquaculture. 2000; 182(3), 261–269.

39. Sarmiento, G & Sarmiento, E. Fundamentos de acuicultura continental, Principios básicos de la criopreservación de esperma de peces. Bogota, Colombia: INPA; 2001. pp 253-263.

40. Shaw, J. M., Oranratnachai, A., & Trounson, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology. 2000; 53(1), 59–72.

41. Singer, S. J., & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science. 1972; 175(4023), 720–731.

42. Seidel, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology. 2006; 65(1), 228–235.

43. Lovelock, J. E. The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. Biochimica et biophysica acta. 1953; 10, 414–426.

44. García, J. V., & Vila, L. Criopreservadores concepto y manejo. Biol Clin Hematol. 1984; 6, 219.

45. Go, K. J. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical perspectives: Andover, Hampshire, United Kingdom: Thomas Publishing Services. 2001- 2002; 1–768. Elsevier.

46. Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C, et al. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 2006; 57(4), 291–300.

47. Tomaniak, A., Tyszkiewicz, I., & Komosa, J. Cryoprotectants for frozen red meats. Meat Science. 1998; 50(3), 365–371. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00043-6

48. MacDonald, G. A., & Lanier, T. C. Cryoprotectants for improving frozen food quality. In M. C. Erikson, & Y. C. Hung (Eds.), Quality in frozen food. 1997; (pp. 197-232). New York: Chapman & Hall.

49. Ma, L. K., Zhang, B., Deng, S. G., & Xie, C. Comparison of the cryoprotective effects of trehalose, alginate, and its oligosaccharides on peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage. Journal of Food Science. 2015; http:// dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12793.

50. Wu, S., Pan, S., & Wang, H. Effect of trehalose on *Lateolabrax japonicus* myofibrillar protein during frozen storage. Food Chemistry. 2014; 160, 281-285.

51. Zhou, A., Benjakul, S., Pan, K., Gong, J., & Liu, X. Cryoprotective effects of trehalose and sodium lactate on tilapia (*Sarotherodon nilotica*) surimi during frozen storage. Food Chemistry. 2006; 96, 96-103.

52. Okazaki, E., & Kimura, I. Frozen surimi and surimi-based products. In I. S. Boziaris (Ed.), Seafood processing: Technology, quality and safety. 2014; (pp. 209–235). West Sussex: JohnWiley & Sons, Ltd.

53. Jin, S. K., Kim, I. S., Jung, H. J., Kim, D. H., Choi, Y. J., & Hur, S. J. Effect of cryoprotectants on chemical, mechanical and sensorial characteristics of spent laying hen surimi. Food and Bioprocess Technology. 2010; doi:10.1007/s11947-11010- 10392-11947.

54. Tomaniak, A. Krioprotektanty w mrozonym miesie. Roczniki Instytutu Przemys\lu Mięsnego i T\luszczowego. 1995, 32, 135–144.

55. Rodríguez, M. Efectos de los polioles en la nutrición y sus aplicaciones en la industria alimentaria. [Grade Work]. [Valladolid, España]: Universidad de Valladolid: 2014. 34p.

56. Liu, Q., Chen, Q., Kong, B., Han, J., & He, X. The influence of superchilling and cryoprotectants on protein oxidation and structural changes in the myofibrillar proteins of

common carp (*Cyprinus carpio*) surimi. LWT - Food Science and Technology. 2014; 57(2), 603–611. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.023

57. Souza, F. C. A. Influência da desnaturação protéica sobre a qualidade do “minced fish” de peixes amazônicos. Ciência de Alimentos. Universidade do Amazonas, Manaus. 2001; 48p.

58. Huidobro, A., Montero, P., & Borderías, A. J. Emulsifying properties of an ultrafiltered protein from minced fish wash water. Food chemistry. 1998; 61(3), 339–343.

59. de Vasconcelos, E. L. Q., Andrade, E. G., & do Perpetuo Socorro, M. Crioprotetores na estabilidade do surimi de matrinxã (*Brycon amazonicus* Spix e Agassiz 1819) sob congelamento. PUBVET, 2006; 10(4), 352–355.

60. Sompongse, W., Itoh, Y., & Obatake, A. Effect of cryoprotectants and a reducing reagent on the stability of actomyosin during ice storage. Fisheries science. 1996; 62(1), 73–79. https://doi.org/10.2331/fishsci.62.73

61. He, X. Y., Kong, B. H., Liu, Q., & Li, P. J. Effect of superchilling on quality characteristics of common carp during storage. Food Science. 2012; 33, 309-312.

62. Jittinandana, S., Kenney, P. B., & Slider, S. d. Cryoprotectants affect physical properties of restructured trout during frozen storage. Journal of Food Science. 2005; 70(1), C35–C42. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09017.x

63. Bigelow, W., & Lee, C. m. Evaluation of various infused cryoprotective ingredients for their freeze–thaw stabilizing and texture improving properties in frozen red hake muscle. Journal of Food Science. 2007; 72(1), C056–C064. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00216.x

64. Ketelsen, S. M., Keay, C. L., & Wiet, S. G. Time-intensity parameters of selected carbohydrate and high potency sweeteners. Journal of Food Science. 1993; 58(6), 1418–1421. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06196.x

65. Larsson, T., E.O. Koppang, M. Espe, B.F. Terjesen, A. Krasnov, H., M. Moreno, and T. Mørkøre. (2014). Fillet quality and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet supplemented with glutamate. Aquaculture 426-427, 288-295. Doi: 10.1016/j. aquaculture.2014.01.034

66. Sánchez-Alonso I, Martinez I, Sánchez-Valencia J, Careche M. (2012). Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius*, L.) by low field NMR. Food Chemistry, 135(3):1626–34.

67. Mohan M, Ramachandran D, Sankar TV, Anandan R. (2007). Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*). Process Biochemistry, 42(7):1056–62. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.005

68. Cao M-J, Jiang X-J, Zhong H-C, Zhang Z-J, Su W-J. (2006). Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*). Food Chemistry, 94(1):7-13.

69. Thermo Scientific. Pierce BCA Protein Assay Kit. Rockford, IL; 2007. p. 1–7.

70. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

71. Hansen A, Morkore T, Rudi K, Langsrud O, Eie T. (2009). The combined effect of superchilling and modified atmosphere packaging using CO2 emitter on quality during chilled storage of pre-rigor salmon fillets (Salmo salar). Journal of the Science of Food and Agriculture, 89, 1625e1633.

72. Olsson G, Olsen R, Carlehög M, Ofstad R. (2003). Seasonal variation in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus). Aquaculture, 217, 191e205.

73. Einen O, Guerin T, Fjæra SO, Skjervold PO. (2002). Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. Aquaculture, 212(1–4):129-40.

74. Ang JF, Haard NF. Chemical composition and postmortem changes in soft textured muscle from intensely feeding Atlantic cod (*Gadius morhua* l). Journal of Food Biochemistry. 1985;9(1):49-64.

75. Kiessling A, Espe M, Ruohonen K, Mørkøre T. (2004). Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO_2 anesthesia. Aquaculture, 236(1–4):645-57

76. Lavety J, Afolabi OA, Love RM. (1988). The connective tissues of fish. International Journal of Food Science & Technology, 23(1):23-30.

77. Liu D, Liang L, Xia W, Regenstein JM, Zhou P. (2013). Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at −3 and 0 °C. Food Chemistry, 140(1–2):105-14. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.034

78. Ladrat C, Verrez-Bagnis V, Noël J, Fleurence J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. Food Chemistry, 81(4):517-25.