

Efecto del almacenamiento congelado de calamar (*Illex argentinus*) sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina de aletas

Effect of frozen storage of squid (*Illex argentinus*) on emulsifier properties of actomyosine from fins

Mignino L (1,2), Tomás M (2,3), Paredi M (1,4)

(1) FCAB- Fac. Cs. Agrarias. UNMDP, Ruta 226Km 73.5, Balcarce.

(2) CONICET- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

(3) CIDCA Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. La Plata. Calle 47 y 1 16, La Plata (1900), Argentina.

(4) CIC- Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires
Elima_1930@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del almacenamiento de calamar congelado sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina (AM) obtenida periódicamente de aletas. Se utilizaron hembras maduras, procedentes de buques poteros, congeladas a bordo ($T=-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) las que fueron transportadas hasta el laboratorio y almacenadas durante 7 meses a la misma temperatura. A tiempo cero (20 días de captura) y a distintos periodos de tiempo, los ejemplares, fueron parcialmente descongelados, descabezados, eviscerados y separados los mantos de las aletas, éstas luego fueron utilizadas para la extracción de AM. Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W) 25:75, con una concentración de proteínas de 2mg/ml, en buffer fosfato 10mM, conteniendo 0,6M ClNa, utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 S 25N-10G, a 20000rpm, 1min. A las mismas, se les midió Índice de Actividad Emulsificante (IAE) mediante un método turbidimétrico y el BackScattering inicial (BSi) mediante un analizador vertical de barrido (QuickScan). Paralelamente, se determinó el tamaño medio de partículas en volumen $D[4,3]$ de las emulsiones, al inicio de la preparación, con un contador de partículas Coulter LS-230, y se estimó el área interfacial creada. El BSi (Back Scattering a tiempo cero) presentó una disminución hacia el tercer mes del almacenamiento, lo cual se correlacionó con los resultados obtenidos para el IAE, que mostró la misma tendencia, aunque no se observaron diferencias significativas. El análisis del tamaño de partículas de las emulsiones mostró una distribución trimodal en los primeros meses de almacenamiento lo que cambió a bimodal cuando las emulsiones fueron formuladas con AM de aletas con mayor tiempo de almacenamiento. El diámetro medio de partículas en volumen $D[4,3]$ mostró una caída al tercer mes de almacenamiento, luego este parámetro se mantuvo sin cambios hacia el final del almacenamiento para las emulsiones formuladas con AM procedentes de aletas de calamar congelados a tiempos largos. Estos resultados sugieren que el almacenamiento congelado afectaría las proteínas, a tiempos cortos, favoreciendo sus propiedades emulsificantes, mientras a que tiempos más prolongados no se modificaría notoriamente dicha propiedad.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the effect of the frozen storage of squid on the emulsifying properties of actomyosin (AM) obtained periodically from fins. Mature female squids *I. argentinus* (de Castellanos) were harvested by commercial vessel on the patagonian shelf. The samples were frozen on board in blocks at -30°C and stored for 7 months. The specimens were gutted and cleaned and after separation of mantles peeled off fin were used for actomyosin extraction. The emulsions (O/W) 25:75 were prepared. The AM a 2mg/ml protein solution (phosphate buffer, pH7, 10mM, 0,6M ClNa) and sunflower oil were homogenized in an Ultra-Turrax T25-10G at 20000rpm for 1min. The emulsion activity index (EAI) by the turbidimetric method and Initial Backscattering (BSi) by a Vertical Scan Analyzer (QuickSCAN) were determined. In addition, the particle size distribution of droplets was determined and the Sauter Mean diameter $D[4,3]$ expressed in differential volume was calculated on the initial emulsion by a laser scattering using a counter Coulter LS-230. A decreased in the initial BSi to 3 months of the storage was observed. The EAI showed the same behavior, though the difference is

not statistically significant. Emulsion prepared with AM from fin frozen stored for a short period exhibited a trimodal distribution. For long periods were bimodal. The D[4,3] showed a fall since 3 months of storage thereafter remained unchanged up to the end of study. These results suggest that the short frozen storage period affects the protein and show better emulsifying properties than long frozen storage period. On the other hand long frozen storage period will not affect significantly this property.

PALABRAS CLAVE: *emulsión, actomiosina, calamar, aletas, almacenamiento congelado.*

KEYWORDS: *emulsion, actomyosin, squid, fins, frozen storage.*

INTRODUCCIÓN

El calamar (*Illex argentinus*) constituye una de las especies más importantes para nuestro país desde el punto de vista económico, ocupando el segundo lugar en cuanto a las toneladas de captura por año, 233.080 tn, luego de la *Merluza hubbsi* (Redes 2008). Las proteínas son utilizadas ampliamente como componentes en la preparación de alimentos por impartir atributos deseables, lo cual está relacionado con sus propiedades funcionales. Las características funcionales de las proteínas están determinadas por su estructura y conformación. En el procesamiento de productos cárnicos las propiedades funcionales son usualmente descriptas en términos de hidratación, solubilidad, propiedades de superficie, de unión y comportamiento reológicos (Xiong 1994).

En sistemas de alimentos, tipo espumas y emulsiones, uno de los componentes más importantes como estabilizadores interfaciales son las proteínas. La capacidad de éstas para favorecer la formación y la estabilización de emulsiones es importante en la elaboración de muchos alimentos procesados y está relacionada con su habilidad para ubicarse en la interfase y reducir la tensión interfacial. Si bien existen algunos estudios sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de calamar son escasos los conocimientos relacionados con sus propiedades emulsificantes (Mignino *et al.* 2007). Estudios previos han informado que el almacenamiento congelado modifica las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la actomiosina (AM) de calamar. (Paredi y Crupkin 1997, Paredi *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2008).

Por lo tanto profundizar los estudios sobre el comportamiento de la AM de aletas de calamar con el almacenamiento congelado, en su rol como agente emulsificante, es de importancia ya que permitiría dar un mayor valor agregado a dichas proteínas, mediante su empleo en la formulación de diferentes sistemas alimenticios.

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto del almacenamiento congelado de calamar sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina (AM) obtenida periódicamente a partir de aletas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares, hembras maduras de calamar (*Illex argentinus*), procedentes de buques poteros, los que fueron congelados enteros a bordo en bloques (T -30 °C), transportados al laboratorio y almacenados congelados a la misma temperatura durante 7 meses a la misma temperatura. A tiempo cero (20 días de captura) y a distintos periodos de tiempo (0, 1, 3, 5 y 7 meses), 3-4 ejemplares fueron parcialmente descongelados, descabezados, eviscerados y separados los mantos de las aletas, éstas luego fueron utilizadas para la extracción de AM y la preparación de las emulsiones.

Preparación de actomiosina

La extracción y purificación de actomiosina (AM) se realizó según lo descripto por Paredi *et al.* (1990). Los precipitados de AM purificada fueron resuspendidos en Buffer fosfato 0,01M, (pH 7) conteniendo 0,6M NaCl. Todos los pasos se realizaron a 0-4 °C.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de actomiosina, fue determinada por el método de Lowry Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma Chemical Co., USA).

Preparación de las emulsiones O/W

La preparación de las emulsiones se llevó a cabo utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 S 25N-10G, con un rotor de 7.5mm de diámetro a 20000 rpm, 1 min. Se formularon emulsiones aceite en agua (O/W) 25:75 (P/V), concentración 2mg/mL de proteína, en buffer fosfato 0.01M, 0,6M NaCl.

Análisis de estabilidad de las emulsiones

Se monitoreó utilizando un analizador vertical de barrido (QuickSCAN) mediante el cual se obtuvo la caracterización óptica de las dispersiones estudiadas. Las muestras son analizadas contenidas en una celda cilíndrica de vidrio. El Quick Scan posee una cabeza lectora móvil compuesta por una fuente pulsátil de luz y dos detectores sincrónicos: uno a 0°, detector de transmisión (T), que recibe la luz que atraviesa la muestra y otro a 135°, detector de Back Scattering (BS), que recibe la luz dispersada por la muestra. La cabeza lectora realiza un barrido a lo largo de la longitud de la celda, obteniendo los valores de "Transmisión" y "Back Scattering", por lo tanto, se registra el flujo de luz transmitida y dispersada en función de la altura de la muestra a distintos tiempos de análisis, pudiéndose analizar los mecanismos y las cinéticas de desestabilización de las emulsiones. El estudio de cada emulsión se realizó durante un período de 1 h con mediciones efectuadas cada 1 min. Se graficó el valor medio de la variación de BS (Back Scattering) en una zona determinada del tubo en función del tiempo y se analizó la cinética correspondiente a cada emulsión a tiempo cero (BSinicial).

Índice de actividad emulsificante (IAE)

El IAE de la actomiosina purificada se determinó de acuerdo al método descrito por Pearce y Kinsella (1978). Se homogeneizaron 2mL de aceite de girasol puro y 6 mL de 0,1% de actomiosina en un Omni-Mixer Sorvall 17106 x 1min, con un micro homogeneizador a 5000 rpm. Se tomaron 50µl de la emulsión de la base del recipiente los que fueron diluidos en 5 mL de buffer fosfato 0,01M, pH 7, conteniendo 0,1% (P/V) de dodecilsulfatosódico (SDS). La lectura de la absorbancia a 500nm inmediatamente después de preparar la emulsión fue expresada como Índice de Actividad Emulsificante (IAE).

Análisis del tamaño de partículas

Se determinó la distribución de tamaño de partículas de las emulsiones a tiempo inicial, en un contador de partículas Coulter LS-230. Se estimó el área interfacial creada a través de las determinaciones de los diámetros medios de gota en superficie [3,2] y en volumen [4,3]. Las mediciones de las emulsiones se realizaron en presencia y en ausencia de SDS (1%)

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza y el Test de Duncan de rangos múltiples, usando el programa Statistica/MAC. Statistica/Mac (1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de Back Scattering inicial (BSi) e Índice de Actividad Emulsificante (IAE), para emulsiones formuladas con AM de aletas de calamar almacenadas congeladas, se muestran en la **Figura 1**. En función del tiempo de almacenamiento congelado se observó una caída significativa ($p \leq 0,05$) en los valores de BSi, a partir del tercer mes, manteniéndose luego, sin cambios hacia el final del mismo. Esto estaría indicando un mejor comportamiento superficial de las proteínas por efecto del almacenamiento congelado a tiempos cortos, lo cual esta relacionado con la presencia de una mayor cantidad de gotas a partir de la formación de la emulsión, detectadas por el equipo. Además esta información se correlaciona con la obtenida mediante el método turbidimétrico, donde pudo observarse la misma tendencia, si bien no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el IAE. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente para emulsiones formuladas con AM proveniente de mantos de calamar para tiempos de almacenamiento cortos (Mignino *et al.* 2007).

En la **Figura 2** se muestra la distribución del tamaño de partículas en volumen, para las emulsiones O/W, formuladas con AM de aletas de calamar almacenado congelado. Las curvas de distribución de tamaño de partículas correspondiente a dichas emulsiones permiten la caracterización inicial de las mismas. Las emulsiones formuladas con AM de tiempos cortos de almacenamiento mostraron una distribución trimodal, siendo la población correspondiente al pico 2 la que contribuye en mayor proporción, con un diámetro medio de 98, 80µm para las partículas que la conforman y en menor medida la población cuya media es de 25.72µm, (**Figura 2**). En cambio, en las emulsiones formuladas con AM de aletas, a tiempos más largos de almacenamiento las distribuciones de partículas tienen una distribución de tipo bimodal, observándose una disminución significativa de la contribución de partículas que corresponde al pico 2. Este comportamiento estaría indicando que se obtienen emulsiones con un tamaño de partículas más uniformes a tiempos prolongados de almacenamiento. Estos resultados se correlacionan con trabajos previos realizados en AM de manto y aletas de *Illex*

argentinus los cuales demostraron cambios en las propiedades fisicoquímicas y funcionales en función del almacenamiento congelado (Paredi y Crupkin 1997, Mignino *et al.* 2006).

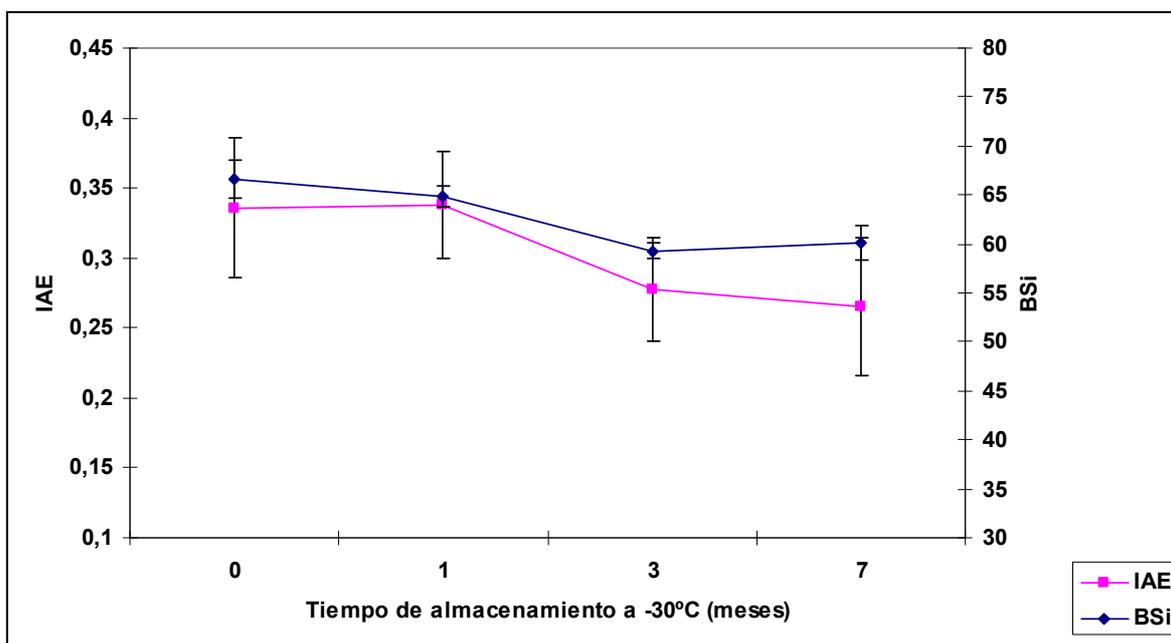


Figura 1. Evolución del BackScattering inicial (BSi) y del IAE (Índice de Actividad Emulsificante) de emulsiones O/W, (25:75), aceite en solución de actomiosina de aletas de calamar en función del tiempo de almacenamiento congelado. Valores promedio \pm SD.

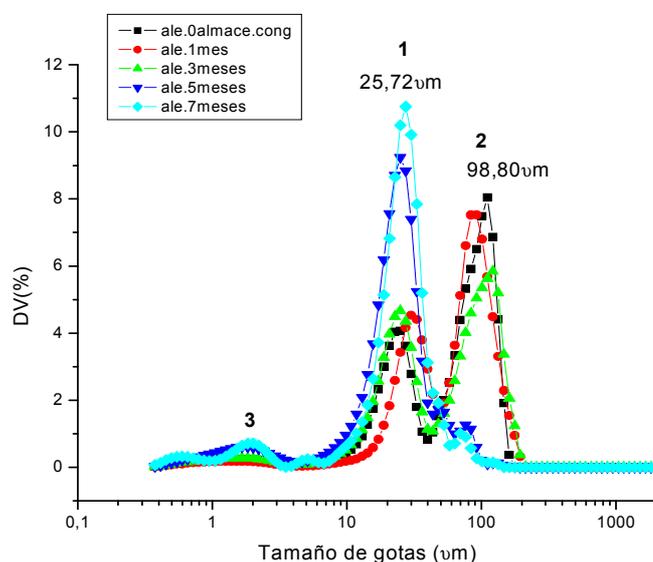


Figura 2. Distribución del tamaño de partículas en Volumen (%) para emulsiones (O/W) 25:75, de actomiosina de aletas de calamar almacenado a -30°C en función del tiempo de almacenamiento congelado. 1, 2 y 3 picos representativos de la curva.

Paredi *et al.* (2006) informaron sobre la presencia de actividad proteolítica en AM de manto de ejemplares inmaduros de *Illex argentinus*, mostrando una degradación de la cadena pesada de miosina (MHC), con la aparición y/o el incremento de componentes polipeptídicos de menor peso molecular. En el mismo trabajo se sugirió que durante el almacenamiento congelado de calamar hay modificaciones en la proteína mayoritaria con proteólisis seguida de desnaturalización-agregación. Cambios en algunos parámetros fisicoquímicos y funcionales de las proteínas de esta especie, como la

caída de los valores de viscosidad reducida y el aumento de la hidrofobicidad superficial por efecto del almacenamiento congelado también fueron informados (Mignino *et al.* 2008). En virtud de lo expuesto, la AM sufriría cambios estructurales, debidos a los procesos de congelación y almacenamiento congelado y a la actividad proteolítica presente, la que impartiría diferentes actividades superficiales a las proteínas. Resultados similares fueron obtenidos para emulsiones obtenidas a partir de AM de manto de calamar almacenados congelados (Mignino *et al.* 2007).

El análisis de las emulsiones en presencia y en ausencia de SDS, permite evidenciar la presencia de agregados de gotas "flóculos" a través de la disociación de los mismos. Por otro lado, la floculación, esta relacionada con la asociación de las gotas de aceite facilitada por las fuerzas netas atractivas entre partículas. La estructura y propiedades de los flóculos dependen de la magnitud de las fuerzas atractivas entre las gotas y la fracción volumétrica de aceite. A bajas fracciones volumétricas (emulsiones diluidas) y con fuerzas atractivas débiles pueden resultar emulsiones débilmente floculadas con flóculos de número pequeño de gotas. Sin embargo, si las fuerzas atractivas son muy fuertes, pueden ocurrir grandes agregados, aún en emulsiones diluidas. Dependiendo del tipo de surfactante empleado, interacciones adicionales como las hidrofóbicas y de hidratación (repulsivas) entre los surfactantes adsorbidos al *film* pueden ser importantes en la promoción o retraso de la floculación de las gotas de aceite (Damodaran 2005). La principal fuerza que previene o retarda significativamente la floculación de gotas de aceite, en emulsiones alimentarias son las estéricas repulsivas. Esto es particularmente muy dominante en emulsiones estabilizadas por proteínas y otros surfactantes poliméricos. En la **Figura 3** se muestra la distribución de partículas en volumen, evaluadas en presencia y ausencia de SDS. Para las emulsiones formuladas a tiempos cortos, se pudo observar que la población que corresponde a mayor tamaño de partículas estaría conformada por el agregado de gotas o flóculos, favorecido por el tipo de uniones atractivas. En este sentido, éste proceso de desestabilización no se estaría evidenciando en emulsiones formuladas con AM de aletas almacenadas a tiempos más largos, sugiriendo que las emulsiones serían más estables frente a éste mecanismo, como resultado de los diferentes tipos de interacciones involucradas.

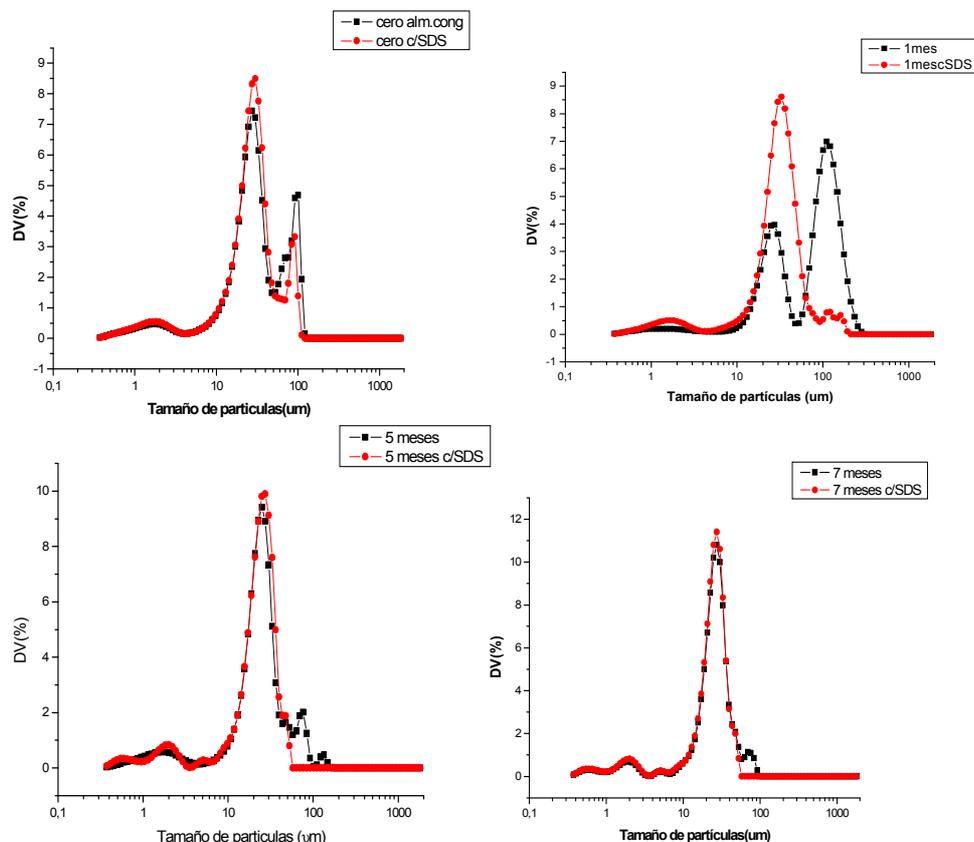


Figura 3. Distribución del tamaño de partículas, en Volumen (%) para emulsiones (O/W) 25:75, de actomyosina de aletas de calamar almacenado a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a distintos tiempos de almacenamiento congelado. ($t = 0, 1, 5$ y 7 meses de almacenamiento congelado con y sin SDS 1%).

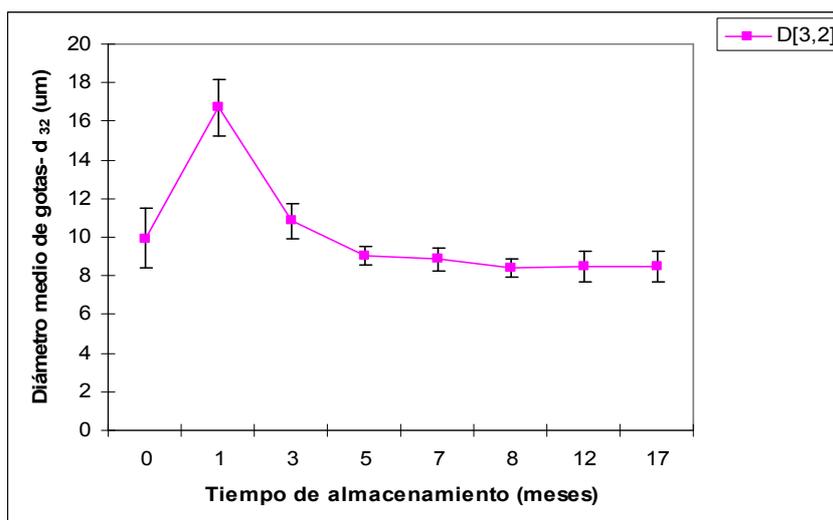


Figura 4. Efecto del almacenamiento congelado sobre el Diámetro medio de partículas en superficie $D_{3,2}$ para emulsiones o/w (25:75), de AM de aletas de calamar almacenado a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Valores promedios \pm SD.

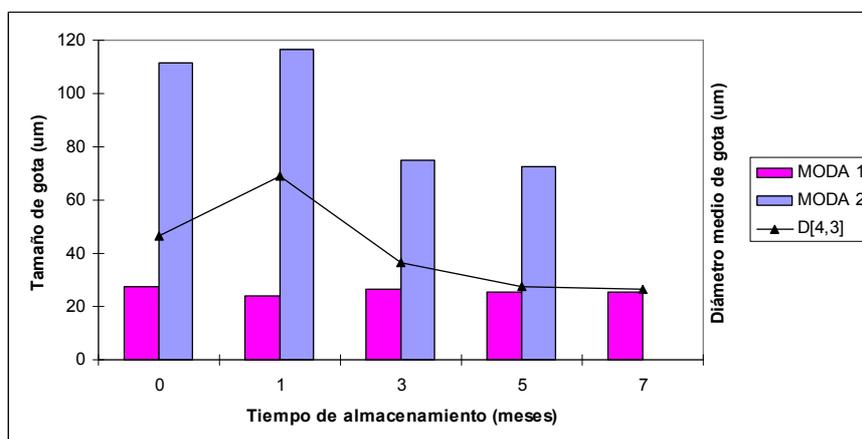


Figura 5. Moda 1 y 2 (tamaño de gota correspondiente al máximo punto de cada pico) y $D[4,3]$ diámetro medio de partículas en volumen de emulsiones O/W, (25:75), aceite en solución de actomiosina de aletas de calamar en función del tiempo de almacenamiento a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Valores promedios \pm SD.

El análisis de los diámetros medios de partículas, el $D[3,2]$ mostró un incremento en los primeros meses, luego disminuyó significativamente ($p < 0,05$) y se mantuvo sin cambios hacia el final del almacenamiento (**Figura 4**), éste parámetro está relacionado con un aumento del área interfacial creada al formar la emulsión. Este comportamiento está de acuerdo con lo observado para la distribución del tamaño de partículas (**Figura 3**) donde se evidencia la presencia de agregados de gotas (flóculos). Con respecto a la evolución del $D[4,3]$, valores significativamente ($p < 0,05$) más altos de este parámetro, fueron observados para los primeros meses de almacenamientos con una caída significativa a partir de los 3 meses, no detectándose modificaciones posteriormente. El análisis de las modas (tamaño de las partículas correspondientes al punto máximo de cada pico) fue realizado a fin de poder determinar la contribución de cada población de partículas a los valores de $D[4,3]$ (Márquez *et al.* 2007). La **Figura 5** permite observar que la moda correspondiente a la población de partículas de menor tamaño (moda 1) (**Figura 2**) no presenta cambios en función del tiempo de almacenamiento congelado. Sin embargo, el valor de la moda correspondiente a la población de partículas de mayor tamaño (moda 2) tuvo un descenso significativo a los 3 meses hasta no detectarse a los 7 meses de almacenamiento congelado. Este hecho puede correlacionarse con la disminución del $D[4,3]$ observada en los primeros meses, mientras que hacia el final del almacenamiento, dichos valores se corresponderían fundamentalmente con las partículas de menor tamaño (moda 1). Un comportamiento

similar se observó para emulsiones formuladas con AM de manto de calamar almacenado congelado (Mignino *et al.* 2007). Trabajos previos realizados con AM de manto y aletas de calamar, han mostrado que la proteína extraída periódicamente de manto y aletas de calamar almacenado congelado sufre modificaciones estructurales que afectan sus propiedades superficiales (Mignino *et al.* 2006, Mignino *et al.* 2008).

CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que el diferente comportamiento observado en las características emulsificantes de la AM de aletas con el almacenamiento congelado podría estar relacionado con los cambios estructurales que sufre dicha proteína. Dichos cambios incidirían en la obtención de emulsiones con estabilidades diferentes frente al proceso de floculación, debido a distintos tipos de interacciones que se producirían por dichos cambios estructurales en función del tiempo de almacenamiento congelado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Repsol-YPF por brindarnos el equipo Coulter LS-230.A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), a la UNMDP- Agencia FONCyT (PICT 06 N°1264), por la subvención de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Damodaran S. 2005. Protein Stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70, 3: 54-59.
- Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement whit the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
- Márquez AL, Palazolo GG, Wagner JR. 2007. Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology. *Colloid and Polymer Science*, 285, 10: 1119 - 1128.
- McClements DJ. 1999. *Food emulsions: Principles, practice and techniques*. CRC, New York.
- Mignino L, Crupkin M, Paredi ME. 2006. Efecto del almacenamiento congelado sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas miofibrilares de aletas de calamar (*Illex argentinus*). *Proceeding del X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Tomo I: 234-242. ISBN- 987-22165-1-7. Publicado en CD
- Mignino L, Tomás M, Paredi ME. 2007. Efecto del almacenamiento congelado de calamar (*Illex argentinus*) sobre las propiedades emulsificantes de actomiosina de manto. *Proceeding del XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Mignino L, Crupkin M, Paredi ME. 2008. Surface hydrophobicity and functional properties of myofibrillar proteins of mantle from frozen-stored squid (*Illex argentinus*) caught either jigging machine or trawling. *LWT*, 41, 4: 678- 685.
- Paredi ME, De Vido de Mattio N, Crupkin M. 1990. Biochemical properties of actomyosin of cold stored striated adductor muscle of *Aulacomya ater ater* (Molina): effect of ionic solutes. *J. Aquatic Food Prod. Technol.*, 3- 4: 133-145.
- Paredi ME, Crupkin M. 1997. Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (*Illex argentinus*) at different sexual maturation stages. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 1629-1632.
- Paredi ME, Roldan HA, Crupkin M. 2006. Changes in myofibrillar proteins and lipids of squid (*Illex argentinus*) during frozen storage. *Journal of Food Biochemistry*, 30: 604–621.

Pearce KN, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of turbidimetric technique. *J Agric. Chem.* 26, 3: 716-726

Redes, de la Industria Pesquera Argentina. 2008. Suplemento Redes Setter N°63: 230- 240. Ed. Segmentos S. A. República Argentina.

Statistica/MAC. 1994. Statistica for Macintosh; Sttatsoft Inc.: Tulsa, OK.

Xiong Y. 1994. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. *Critical Reviews in Food Science and Nut.* 34, 3: 293-320.