

Efecto de la congelación y cocción sobre la textura y patrón electroforético de las proteínas de brazos de pulpo (*Octopus vulgaris*).

Genara Reyes, Mauro Nirchio, Rafael Bello y Javier Borderías

Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
Instituto del Frío, Madrid, España.

RESUMEN: La textura es la característica más valorada en los cefalópodos. Los factores que principalmente afectan la textura del pulpo son congelación, escaldado y cocción. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la congelación, escaldado y diferentes tiempos de cocción sobre la textura y perfil electroforético de las proteínas de brazos de pulpo (*Octopus vulgaris*). Los ejemplares fueron capturados con nasa en las cercanías de la Isla de Margarita y transportados al laboratorio, donde fueron empacados y sometidos a: a) congelación a -27°C ó a -20°C b) escaldado o no escaldado c) cocción por 25, 35 ó 45 min. Se determinó la fuerza de corte sobre tiras de brazo de pulpo mediante celda de Kramer. Extractos de proteínas fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % según método Laemmli. Fue realizada evaluación sensorial de la preferencia de la textura empleando escala hedónica de 7 puntos y panel no entrenado. La textura del pulpo no resultó afectada ni por la temperatura de congelación ni el escaldado. El pulpo congelado, al cocerlo, fue más blando que el fresco. En la medida que aumentó el tiempo de cocción, el pulpo se ablandó más. La cocción no afectó significativamente la cadena pesada de miosina (MHC) (205 kD); sin embargo, causó aparición de agregados proteínicos más pesados, nuevas bandas y pérdida de definición de bandas. Las fracciones de miosina y de paramiosina resultaron más afectadas cuando el pulpo fue congelado previo a la cocción.

Palabras clave: Pulpo, *Octopus vulgaris*, textura, perfil electroforético, congelación, cocción.

SUMMARY: Effect of freezing and cooking on the texture and electrophoretic pattern of the proteins of octopus arms (*Octopus vulgaris*). Texture is the most valuable feature in cephalopods. Factors that mainly affect the texture of octopus are: freezing, scalding and cooking. The aim of this study was to assess the effect of freezing, scalding and length of cooking time on the texture and electrophoretic pattern of proteins of octopus arms. Octopuses were trapped near Margarita Island and carried with ice to the laboratory where they were packed and subjected to: a) freezing at -27°C or at -20°C b) scalding c) cooking for 25 min, 35 min or 45 min. Shear force was determined by Kramer cell on strips of octopus arms. SDS-PAGE was done according to the Laemmli method with 12% polyacrilamide gels. A sensory evaluation of the preference of texture was carried out using a hedonic scale of 7-points and a non-trained panel. Octopus texture was not affected by freezing temperature or scalding. Frozen octopus was softer after cooking than fresh. The longer the cooking time was, the softer the octopus was. Myosin heavy chain (MHC) was not significantly affected by scalding or cooking; however large aggregates heavier than MHC, new bands and loss of resolution of the bands appeared. Myosin and paramyosin bands were more affected by freezing prior to cooking.

Key words: Octopus, *Octopus vulgaris*, texture, electrophoretic pattern, freezing, cooking.

INTRODUCCIÓN

Los desembarcos y el consumo de cefalópodos se han ido incrementando a nivel mundial desde hace varias décadas, lo cual es debido

a que son una buena fuente de proteínas con una alta proporción de lípidos poliinsaturados n-3, además de su apreciado sabor y textura (1-2) que han dado origen a una amplia gama de

preparaciones culinarias de vanguardia. Estos animales poseen una alta actividad enzimática postmortem que favorece el crecimiento bacteriano y conduce a un rápido deterioro (3-4). El músculo de los cefalópodos es generalmente duro y elástico, debido a la doble función que ejecuta en la locomoción y como soporte esquelético lo que explica que el músculo esté constituido por un elevado contenido de tejido conectivo y presente un denso empaquetamiento de las fibras musculares organizadas en sentido circular, transversal, longitudinal y oblicuo (5-6). La característica sensorial más valorada en los cefalópodos es la textura y los cambios postmortem que se producen en la textura del músculo de cefalópodos dependen básicamente de cambios en la estructura del tejido conectivo, fibras musculares y estructura celular, entre otros (7). Los factores que más afectan la textura del pulpo son congelación, escaldado y tiempos de cocción (8-11). La congelación puede romper estructuras tales como membranas celulares, lisosomas, entre otros y favorecer un ablandamiento parcial que mejora la textura del pulpo que es generalmente dura (12). El escaldado, que consiste en la inmersión y extracción inmediata del pulpo en agua hirviente, se practica comúnmente en España como una manera de mejorar la textura y evitar la pérdida de la piel durante la cocción. Los tiempos de cocción para lograr la mayor ternura del músculo de los cefalópodos varían en función de la especie y talla del animal. El pulpo normalmente se cuece por tiempos entre 25 y 45 min (9-11, 13-14) pero, si se deja cocer por mucho tiempo, la textura se vuelve dura y correosa debido a entrecruzamiento de proteínas miofibrilares (11, 13). Las alteraciones de las proteínas pueden ser monitoreadas mediante electroforesis debido a los cambios que se producen en su estructura y funcionalidad por efecto de los métodos de preservación (15). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la congelación, escaldado y de diferentes tiempos de cocción sobre la textura y perfil electroforético de las proteínas de brazos de pulpo *Octopus vulgaris* colectados en la Isla de Margarita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de pulpo *Octopus vulgaris* (N= 84) fueron capturados con nasa por pescadores artesanales entre julio y agosto del año 2006 cuando el recurso es más abundante y asequible (16). Fueron colocados en cavas con hielo y transportados al laboratorio, donde se lavaron, empacaron y dividieron en grupos para ser sometidos a los siguientes tratamientos: a) Congelación a -20 °C (por aire tranquilo marca Marquette, USA S/Mod) ó a -27 °C (congelador por aire forzado marca FYS, Guangzhou, China) por un tiempo de 2 meses b) Escaldado o no, el cual consistió en la inmersión de pulpos en agua a 100 °C y su extracción inmediata, proceso que se repitió por 3 veces c) Cocción en agua a 100 °C por 25, 35 ó 45 min d) Muestra control constituida por pulpos frescos mantenidos en hielo. Estos tiempos fueron escogidos como los más apropiados para ablandar la textura del pulpo según diversos autores (5, 9-11, 13-14, 17). En cada tratamiento ensayado se emplearon 3 pulpos y cada análisis se realizó por lo menos por triplicado.

Textura Instrumental

Para el análisis de la textura se cortaron tiras de brazo de pulpo de 7 cm x 1 cm x 3 mm, mediante rebanadora industrial Braher Internacional, las cuales se pesaron en balanza analítica marca Denver Instrument modelo XS-210 y sobre las cuales se determinó la fuerza máxima de corte mediante un texturómetro Stable Microsystems TA-XT2 (Hamilton, MA, USA) usando la celda de Kramer. Se empleó una celda de carga de 50 kg a una velocidad de cabezal de 1,5 mm/s. Se realizaron 5 mediciones por muestra tratando siempre de tomar la misma zona para evitar variación en los resultados debido a la localización anatómica.

Evaluación Sensorial

Se realizó una prueba para ordenar la firmeza de muestras de pulpo cocido a los diferentes tiempos, empleando un panel semi-entrenado (N=12). El entrenamiento de los panelistas se

llevó a cabo a través de 3 sesiones con pruebas de ordenación donde se evaluaban muestras de pulpo fresco y cocido a los diferentes tiempos ensayados (25, 35 y 45 min) y muestras de pulpo almacenado en congelación por 0, 1 y 2 meses y sometidos a los diferentes tiempos de cocción. También se realizó una prueba para evaluar la preferencia por la textura del pulpo en función de la temperatura y tiempo de congelación y tiempo de cocción empleando una escala de 7 puntos donde 7= me gusta extremadamente y 1= me desagrada extremadamente. Esta prueba se llevó a cabo con un panel no entrenado (N=30). Las muestras cocidas y enfriadas a temperatura ambiente fueron codificadas aleatoriamente, balanceadas y presentadas a los panelistas en forma de rodajas de brazo de 1 a 2 cm de diámetro y 0,5 cm de longitud aproximadamente.

Electroforesis

Para la electroforesis se empleó el método de Laemmli (18). Se pesaron 100 mg de brazo de pulpo, se homogeneizaron con 500 μ l de SDS 10% por 1 min. Se tomaron 100 μ l del sobrenadante, que fue mezclado con 100 μ l de buffer de la muestra (glicerol 50%, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, tris HCl pH 6,8); se hirvió la mezcla por 5 min a 100 °C. Se tomaron 50 mg proteína/ml aproximadamente que fueron colocados en los pocillos del gel para la corrida electroforética. La concentración de las proteínas se determinó por el método de Lowry (19). Las corridas electroforéticas se realizaron en geles con 12 % de poliacrilamida durante 50 min, aplicando 150 V, en un equipo Mini-Protean 3 marca Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Las fracciones proteínicas fueron teñidas con azul brillante Coomassie y destañadas con una solución de ácido acético 10%, metanol 10% y agua 80%. Las masas moleculares de las principales proteínas miofibrilares de las muestras fueron estimadas comparando su movilidad con la de un estándar de amplio peso molecular Pierce (Miosina 205 kD, Fosforilasa B 100 kD, Albúmina de Suero Bovino (BSA) 66 kD, Ovoalbúmina 45 kD, Anhidrasa Carbónica 29 kD, Inhibidor de Tripsina 20 kD y Lisozima 14 kD).

Análisis Estadístico

Se empleó ANOVA Multifactorial para evaluar las diferencias entre tratamientos y como test a posteriori, la prueba de rango múltiple LSD a un nivel de significancia de 5% ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Statgraphics V 5.1. En caso de interacciones significativas en el ANOVA, las diferencias entre las muestras se evaluaron mediante gráficos de interacción empleando intervalos de LSD al 95% de confianza. La concordancia del panel durante las pruebas de ordenación utilizadas en el entrenamiento de los panelistas se analizó mediante el test no paramétrico coeficiente de Kendall. Para evaluar los resultados de la prueba se hicieron comparaciones múltiples para datos ordenados con $N=12$ (panelistas) y $K=3$ (tratamientos) según Newell y MacFarlane (1987) (20).

RESULTADOS

En la Figura 1 se evidencia: a) que las muestras mantenidas en hielo (0 ° C) fueron más duras ($P < 0,05$) que las congeladas a -20 y a -27 ° C; b) que la congelación (independientemente de la temperatura) ocasionó ablandamiento en las muestras de pulpo y c) un ligero ablandamiento ($P < 0,05$) en la muestra escaldada y mantenida a 0 ° C, aunque cabe mencionar que en este estudio, en general, no se apreciaron variaciones significativas en la fuerza de corte del pulpo sometido a los diferentes tratamientos por efecto del escaldado. En la Figura 2 se aprecia que las muestras de pulpo crudo (0 min cocción) ameritaron una mayor fuerza de corte ($P < 0,05$) que las muestras cocidas y que éstas se hicieron más blandas en la medida que aumentó el tiempo de cocción, siendo el pulpo cocido por 45 min el más blando. La Figura 3 muestra que tanto la congelación (a -20 y a -27 ° C) como el incremento en el tiempo de cocción ejercen un efecto ablandador sobre la textura. También se aprecia que el pulpo fresco mantenido en hielo siempre requirió una mayor fuerza de corte ($P < 0,05$) que el pulpo previamente congelado. En las pruebas de ordenación de la textura

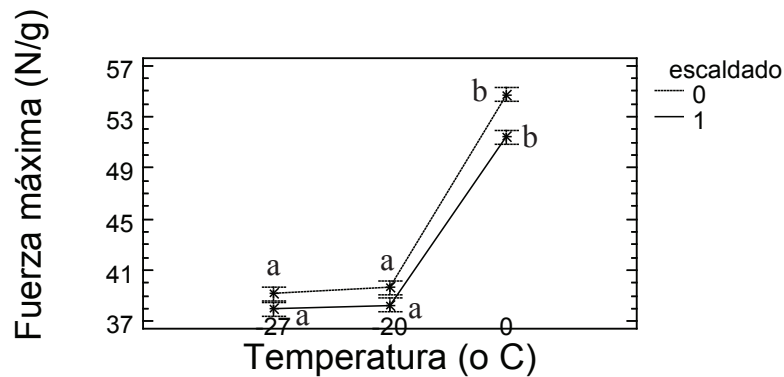


FIGURA 1. Fuerza máxima de corte del pulpo fresco a 0 °C y congelado (tiempo 0) en función de la temperatura de almacenamiento y el escaldado. 0=sin escaldar, 1=escaldado. Cada valor con su respectivo intervalo en la curva representan el promedio y la desviación estándar de 9 determinaciones (N=9). En cada curva las letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos.

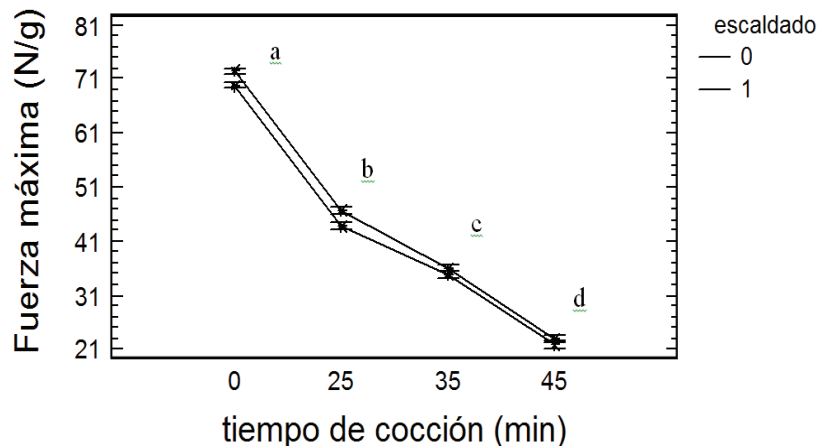


FIGURA 2. Fuerza máxima de corte del pulpo en función del tiempo de cocción y escaldado. 0=sin escaldar, 1=escaldado. Cada valor con su respectivo intervalo en la curva representan el promedio y la desviación estándar de 9 determinaciones (N=9). En cada curva las letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) entre los tratamientos.

(datos no mostrados) los panelistas hallaron que las muestras previamente congeladas y luego cocidas fueron más blandas que las muestras de pulpo cocido sin congelación previa (fresco) y no encontraron diferencias significativas en la dureza de los pulpos frescos cocidos a los diferentes tiempos. En la prueba hedónica de la textura (Tabla 1) los panelistas prefirieron el pulpo cocido por 45 min calificándolo con una

media de 5,69 equivalente a “me gusta mucho”. En el patrón electroforético de las proteínas de pulpo fresco sometidas a diversos tratamientos (Figure 4) destacan: MHC (205 kD), paramiosina (100 kD), actina (45 kD) y troponina (31 kD). En la muestra control se visualizan 4 fracciones secundarias, con pesos moleculares entre 66 y 45 kD que se corresponden con BSA y ovoalbúmina. Además, se aprecia una banda de 45 kD que se

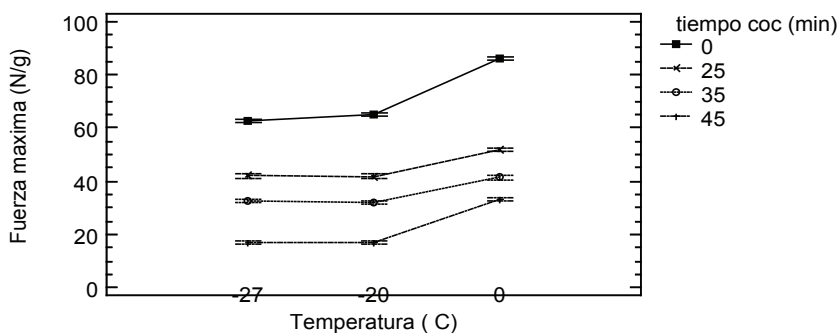


FIGURA 3. Fuerza máxima de corte del pulpo en función del tiempo de cocción y la temperatura de almacenamiento. Cada valor con su respectivo intervalo en la curva representan el promedio y la desviación estándar de 9 determinaciones (N=9). En cada curva las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos

TABLA 1. Calificaciones de los panelistas en la evaluación de la preferencia de la textura del pulpo en función del tiempo de cocción.

| Tiempo cocción (min) | Media \pm desviación estándar |
|----------------------|---------------------------------|
| 25 | 4,49167 a $\pm 0,0923035$ |
| 35 | 4,94167 b $\pm 0,0923035$ |
| 45 | 5,69167 c $\pm 0,0923035$ |

Se presenta media \pm desviación estándar (N=90). Escala hedónica donde 1=Me desagradó extremadamente y 7=Me gustó extremadamente. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según test a posteriori LSD.

corresponde con la actina y otra banda de 31 kD que coincide con la fracción de troponina. La cadena más pesada de miosina (205 kD) permaneció sin alteraciones aparentes a causa del tratamiento térmico. También se observa que la distancia entre la aparición de una nueva banda polipeptídica de aproximadamente 155 kD. Asimismo, se aprecian agregados proteicos más pesados que 205 kD que se hicieron más evidentes a medida que aumentó el tiempo de cocción. En el rango entre 66 y 45 kD, se evidencia que las 4 bandas visualizadas en la muestra control se reducen a 3 bandas claramente definidas en la muestra escaldada cuya intensidad, definición y migración en el campo eléctrico disminuyeron al aumentar el tiempo de cocción, apareciendo una

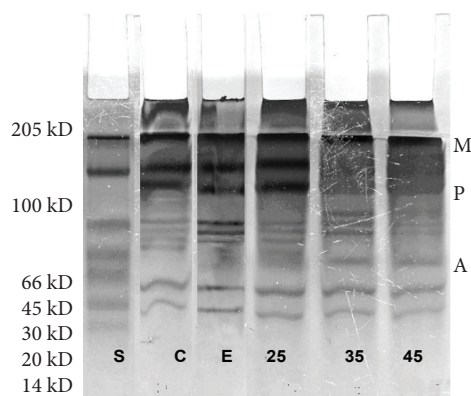


FIGURA 4. Patrón electroforético SDS-PAGE de las proteínas del pulpo fresco sometido a diversos tratamientos. S=patrón de peso molecular, C= muestra control; E= pulpo escaldado; 25=pulpo cocido por 25 min; 35=pulpo cocido por 35 min; 45=pulpo cocido por 45 min. M=miosina, P=paramiosina, A=actina.

nueva banda de 45 kD en las muestras cocidas por 35 min y 45 min. Además, se visualizan 2 bandas en el rango de masa moleculares entre 30 kD y 20 kD en la muestra control y escaldada, cuya intensidad se va atenuando con el tiempo de cocción. La congelación del pulpo previo a la cocción (Figure 5) generó engrosamiento en la banda de paramiosina (muestra control) y pérdida de definición de las bandas localizadas entre 97 y 205 kD que se aprecian como una zona difusa.

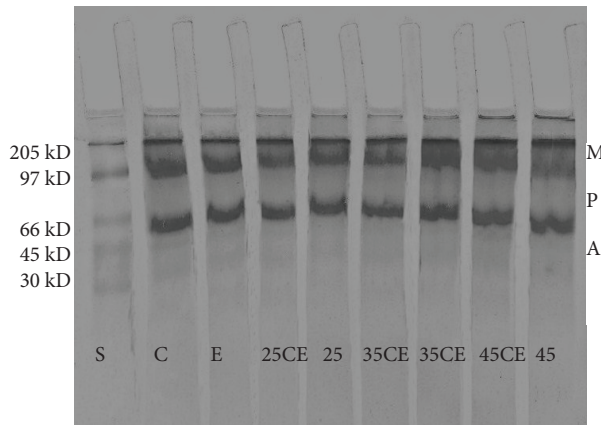


FIGURA 5. Patrón electroforético SDS-PAGE de las proteínas del pulpo congelado a -20°C por 2 meses y sometido a diversos tratamientos. S=patrón de peso molecular: miosina 205 kD, fosforilasa B 97 kD, BSA 66 kD, ovoalbúmina 45 kD, anhidrasa carbónica 29 kD. C= muestra congelada, E= pulpo escaldado; 25CE=pulpo escaldado y cocido por 25 min; 25 =pulpo cocido por 25 min; 35CE=pulpo escaldado y cocido por 35 min; 35 =pulpo cocido por 35 min; 45CE=pulpo escaldado y cocido por 45 min; 45 =pulpo cocido por 45 min. M=miosina, P=paramiosina, A=actina.

DISCUSIÓN

Los resultados del análisis instrumental de textura indican que el tiempo óptimo de cocción del pulpo fue 45 min lo cual concuerda con lo hallado por los panelistas durante la evaluación sensorial y con la bibliografía (11, 13). La evaluación sensorial mostró que los pulpos frescos, sometidos a distintos tiempos de cocción, no se ablandaron en ninguno de los tiempos ensayados, lo cual confirma lo que es conocido en regiones con tradición de alto consumo de pulpo, como es el caso de Galicia en España, que el pulpo fresco no puede ser cocido inmediatamente después de su captura, pues siempre permanecerá de textura dura y correosa independientemente del tiempo de cocción empleado. El hecho de que el escaldado bajo condiciones controladas no haya afectado la textura del pulpo, demuestra que

la costumbre de los pueblos consumidores de este cefalópodo de escaldar el pulpo antes de cocerlo para que se pueda ablandar, carece de fundamento. El escaldado sirve más bien para que el músculo se retraiga, la piel no se desprenda y sea más fácil su manipulación durante la cocción posterior. La congelación actuó ablandando el tejido del pulpo debido a que puede romper estructuras tales como membranas celulares, lisosomas, entre otros (12, 17). El patrón electroforético de las proteínas de pulpo fresco muestra que las MHC son las primeras proteínas miofibrilares en hidrolizarse, seguidas de la paramiosina. Esto es similar a lo hallado en el estudio del patrón electroforético en SDS-PAGE del manto de calamar almacenado en hielo (15) donde se observó degradación de la MHC y aparición de nuevas bandas atribuidas a producto de proteólisis de dichas cadenas. El patrón electroforético del pulpo observado en este estudio es similar al reportado en diferentes especies de calamar (21). La fracción de la banda polipeptídica de 155 kD y de la paramiosina (100 kD) disminuyeron en intensidad y se visualizan como una zona difusa oscura en las muestras cocidas por 35 y 45 min reflejando cambios en las proteínas ocasionados por el calor, tales como deshidratación y compactación de las fibras musculares, gelatinización del colágeno, ruptura de las cadenas proteicas, entre otros (13). La fracción de 155 kD probablemente sea el resultado de la hidrólisis de la MHC por efecto de la alta tasa de autólisis evidenciada en el pulpo fresco almacenado en hielo (22). El electroforetograma del pulpo sometido a cocción evidenció que a medida que se incrementó el tiempo de cocción se observó la aparición de polímeros que superaban los 205 kD, lo que puede explicarse como el resultado de la formación de agregados más pesados de proteínas desnaturalizadas que prácticamente no migran en el campo eléctrico (23). Al comparar el electroforetograma del pulpo fresco con el congelado por 2 meses (Figuras 4 y 5) se aprecia que las bandas de miosina y de paramiosina aparecen más tenues y difusas. También se observa aumento en el

grosor de la banda de miosina por efecto de agregados proteicos de más de 205 kD debido a la congelación y el tratamiento térmico. La actina resistió los diversos tratamientos coincidiendo con lo señalado por otros autores (21, 24).

CONCLUSIONES

Los resultados tanto del análisis instrumental de la textura como la evaluación sensorial evidenciaron que las muestras de pulpo fresco en hielo fueron más duras que las previamente congeladas. Ni la temperatura de congelación ni el escaldado afectaron significativamente la textura. El tiempo óptimo de cocción del pulpo para lograr la mayor ternura fue de 45 min. En el perfil electroforético de las proteínas del pulpo fresco se visualizan claramente la MHC, paramiosina, actina y troponina. Los diversos tratamientos calóricos aplicados no afectaron significativamente la MHC; sin embargo, generaron aparición de agregados proteicos más pesados, desaparición de bandas para formar fracciones nuevas de menor peso molecular; atenuación y pérdida de definición de bandas, entre otros. La congelación previa a la cocción ocasionó mayor deterioro en las bandas de miosina y de paramiosina que cuando se aplicó solo cocción al pulpo fresco. Estos resultados sugieren emplear la congelación como un método práctico para ablandar el pulpo antes de cocerlo.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue posible gracias al financiamiento otorgado por la OPSU a través del Proyecto Alma Mater y al Consejo de Investigación de la UDO mediante el Proyecto titulado "Estudio de los cambios en la textura y color del pulpo almacenado en congelación"

REFERENCIAS

1. Sykes A, Oliveira A, Domingues P, Cardoso C, Andrade J, Nunes, M. Assessment of European cuttlefish nutritional value and freshness under ice storage using a developed Quality Index Method (QIM) and biochemical methods. *LWT-Food Sci. Technol.* 2009; 42, 424-432.
2. Ozogul Y, Duysak O, Ozogul F, Serhat A, Tureli C. Seasonal effects in the nutritional quality of the body structural tissue of cephalopods. *Food Chem.* 2008; 108, 847-852.
3. Stanley D.W, Hultin H.O. Proteolytic activity in North American squid and its relation to quality. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1984; 17, 163-167.
4. Atrea I, Papavergou A, Amvrosiadis I, Savvaidis I. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*O. vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 2009; 26, 166-172.
5. Stanley D.W, Smith A.K. Microstructure of squid muscle and its influence on texture. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1984; 17, 209-213.
6. Harrison F.W, Kohn A.J. Microscopic anatomy of invertebrates. *Mollusca II*, Vol 6A. New York: Wiley-Liss; 1997.
7. Kugino M, Kugino K, Wu Z. Rheological properties of dried squid mantle change on softening. *J. Food Sci.* 1993; 58, 321-324.
8. Stanley DW, Hultin HO. Quality factors in cooked North Atlantic squid *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1982; 15, 277-282.
9. Sikorski Z.E, Kolodziejska I. The composition and properties of squid meat. *Food Chem.* 1986; 20, 213-224.
10. Nitisewojo P. Effect of frozen storage on the texture of squid (*Loligo sp*) mantle. *Asean Food J.* 1987; 3, 72-73.
11. Kolodziejska I, Sikorski Z.E, Sadowska M. Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influenced by specimen characteristics and treatments. *J. Food Sci.* 1987; 52, 932-935.
12. Ruiz-Capillas C, Moral A, Morales J, Montero P. Viscosity and emulsifying capacity in pota and octopus muscle during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.* 2003; 83, 1168-1175.
13. Chu Y.J, Chow C.J, Kuo J.D. The changes in texture and muscle structure of squid mantle during heating. *J. Fish. Soc. Taiwan* 1995; 22, 137-146.
14. Katsanidis E. Impact of physical and chemical

- pretreatments on texture of octopus (*Eledone moschata*). *J. Food Sci.* 2004; 69, 264-267.
15. Gómez-Guillén M.C, Martínez-Álvarez O, Montero P. Functional and thermal gelation properties affected by chilled and frozen storage. *J Food Sci.* 2003; 68, 1962-1967.
 16. INSOPESCA. Estadísticas pesqueras. Instituto Socialista de la Pesca, Edo. Nueva Esparta; 2013.
 17. Hurtado J.L, Montero P, Borderías A.J. Behavior of octopus muscle (*Octopus vulgaris*) under a process of pressure-time-temperature combinations. *Food Sci. Technol. Int.* 2001; 7, 259-267.
 18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227, 680-682.
 19. Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J. Protein measurement with Foulin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193, 265-275.
 20. Newell G.J, MacFarlane J. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *J. Food. Sci.* 1987; 52, 1721-23.
 21. Park S, Cho S, Yoshioka T, Kimura M, Nozawa H, Seki N. Influence of endogenous proteases and transglutaminase on thermal gelation of salted squid muscle paste. *J. Food Sci.* 2003; 68, 2473-2478.
 22. Hurtado J.L, Borderías J, Montero P, An H. Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle *J. Food Biochem.* 1999; 23, 469-483.
 23. Tejada M, Careche M, Torrejón P, Del Mazo M.L, Solas M.T, Garcia M.L, Barba C. Protein extracts and aggregates forming in minced cod during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44, 3308-3314.
 24. Gómez-Guillén M.C, Hurtado J.L, Montero P. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. *J. Food Sci.* 2002; 67, 2491-2496.

Recibido: 24-04-2014

Aceptado: 12-08-2014