



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Análisis de la pérdida de textura de
la carne de Yamú (*Brycon
amazonicus*) por efecto de la
congelación**

Daniel Castañeda Valbuena

Universidad Nacional de Colombia
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, Colombia
2016

Análisis de la pérdida de textura de la carne de Yamú (*Brycon amazonicus*) por efecto de la congelación

Daniel Castañeda Valbuena

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: **Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director:

Ph.D. Héctor Suárez Mahecha

Codirector

Ph.D. José Manuel Lozano Moreno

Línea de Investigación:

Ciencia de productos acuícolas

Grupo de Investigación:

Ciencia y Tecnología de productos cárnicos y acuícolas

Universidad Nacional de Colombia

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2016

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis Padres y Hermanos, quienes me acompañaron durante este proceso.

A mi novia Natalia quien me apoyo y alentó para continuar, especialmente cuando sentía que me iba a rendir.

A mis amigos Andrea Carolina, Paco, Sandra, Adriana, Ángela, Andrés, Andrea Paola, Charlie y a todos con los que compartí durante todo este tiempo.

A Héctor quien siempre creyó en este como un una gran idea de investigación y a pesar de los miles de inconvenientes que se presentaron, el siempre insistió en seguir adelante.

A José Manuel, quien sin conocerme y a cambio de nada, acepto ser parte de este proyecto haciendo valiosos aportes.

A mis maestros Luis Felipe y Jairo quienes siempre estuvieron presentes para apoyarme con la realización del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial al profesor Héctor Suarez, por haber confiado en mí para el desarrollo de esta investigación y por haber tenido la paciencia para explicarme como sortear cada uno de los inconvenientes encontrados durante el transcurso de la investigación.

Muchas gracias doy a todos los que hicieron, y hacen parte del laboratorio de carnes del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia,

A todos los que de manera directa e indirecta ayudaron en la realización de este trabajo, especialmente a los profesores José Manuel Lozano y Ángel Yobany Sánchez. Sin su apoyo este proyecto no se hubiese logrado.

También agradezco a mis padres, quienes de desde la distancia siempre estuvieron apoyándome para sacar adelante mi carrera y tesis. Natalia Cucaita, quien fue un soporte especial en los momentos de dificultad que esta investigación tuvo.

RESUMEN

El propósito de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la conservación en frío sobre la carne del pescado Yamú (*Brycon amazonicus*), utilizando un diseño factorial 2 X 2 X 3; utilizando dos temperaturas diferentes de almacenamiento ($0^{\circ}\text{C}\pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$) y dos tiempos de conservación (13 horas y 61 horas), adicionalmente se estudió el sistema con animales de dos orígenes distintos (cultivo y río). Durante el experimento se analizaron los cambios en el perfil proteico y en la estructura muscular, a las muestras de filetes en estado fresco y almacenado. Fueron realizados análisis microestructurales por medio de microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica. Las propiedades fisicoquímicas fueron determinadas por medio de análisis de capacidad de retención de agua CRA, pH, perfil proteico (SDS - Page) y textura de la carne. Los resultados del análisis de las imágenes de la microestructura de la carne mostraron un efecto negativo de la conservación en frío sobre el músculo en general, observándose alteraciones en la superficie muscular. Así mismo los resultados obtenidos del análisis de la microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido, mostraron que el efecto del frío en el músculo afectó el tejido conectivo, evidenciándose una pérdida de textura. Por otro lado el perfil proteico sufrió alteraciones leves en la Miosina de cadena pesada (WHC), Troponina (~80KDa) y en la Actina (~45KDa), aspecto que sugiere que durante la conservación en frío de la carne de Yamú, la degradación de las proteínas miofibrilares puede ser responsable de la pérdida de textura. El origen de los peces tuvo efecto significativo en los cambios de textura ($p < 0.05$), por su parte el tiempo de almacenamiento tuvo efecto significativo sobre las tres características tecnológicas de la carne (CRA, pH y Textura) ($p < 0.05$); por su parte la temperatura de almacenamiento no afectó de manera significativa la CRA ($p > 0.05$).

Palabras Clave: Músculo de pescado, Yamú, proteólisis, SEM, almacenamiento en frío, Textura, Capacidad de retención de Agua.

ABSTRACT

The purpose of this work consisted in evaluating the effect of the storage in cold on the flesh of the fish Yamú (*Brycon amazonicus*), using two different storage temperatures (0°C and - 8°C) and two different times of conservation (13 hours and 61 hours). In addition, we studied the system with fish from two different resources (cultivated and river). Samples of fresh and stored fillets were used during the experiment; changes were analyzed in the protein profile and in the muscle structure. Microstructural analyses were done by optical and scanning electron microscopy. The physical-chemical properties were determined by the analysis of water retention capacity CRA, pH, protein profile and the texture of the flesh. The results of the microstructure images showed a negative effect on the muscle preservation caused by the storage in cold. The outcome obtained from the analysis of the optical and scanning electron microscopy, showed that the effect of the cold on the muscle affected the connective tissue too. On the other hand protein Profile suffered minor alterations in myosin heavy chain (WHC) , troponin (~ 80 kDa) and actin (~ 45 kDa) , effect that suggest during cold storage of meat Yamu , the degradation of myofibrillar proteins may be responsible for the loss of texture. The origin of the fish had a significant effect on changes in texture ($p < 0.05$), while the variation of pH, only emphasized the texture of fish stored for 61 hours. However, the storage time had a significant effect on the three technological characteristics of the meat (CRA, pH and texture) ($p < 0.05$); while, the storage temperature did not affect significantly the CRA ($p < 0.05$), but it influenced the texture and pH of the Yamú meat ($p > 0.05$).

Keywords: Fish muscle, Yamú, proteolysis, SEM, cold storage, texture, water holding capacity.

Contenido

Tabla de Imágenes	9
Tabla de gráficos.	10
Lista de anexos.....	10
Introducción.....	11
Objetivos.	15
General.	15
Específicos.....	15
Planteamiento del problema.	16
Hipótesis.	17
Capítulo 1.....	18
Cambios en la estructura y en las proteínas miofibrilares del músculo del Yamú durante la conservación en frío y el efecto sobre las características físicas.....	18
Resumen	18
Abstract.....	19
Introducción.....	20
Metodología	22
Material Biológico	22
Extracción de proteínas del tejido muscular de Yamú	23
Cuantificación de proteínas	24
Electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) 24	
Análisis de Microscopía.	25
Capacidad de retención de agua (CRA) de muestras cárnicas de Yamú.....	26
Análisis de textura de la carne de Yamú	27
Análisis estadístico.....	29
Resultados y discusión.....	29
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
Microscopía óptica	33
Capacidad de retención de agua (CRA) de muestras cárnicas de Yamú.....	38
Análisis de textura de la carne de Yamú	40

Determinación de pH de las muestras de cárnicas de Yamú	41
Degradación proteica.....	43
Conclusiones y recomendaciones	46
Conclusiones.....	46
Recomendaciones.....	47
Anexos	49
Test de múltiples rangos para pH Vs Origen (13 horas – 16 horas).....	52
Bibliografía	56

Tabla de Imágenes

Imagen 1: Brycon Amazonicus. Superior: Ejemplar capturado en río. Inferior: ejemplar capturado en sistema de cultivo.....	11
Imagen 2: Filete de Brycon amazonicus conservado durante 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$	22
Imagen 3. A) Porciones de tejido cárnico de Yamú envuelto en papel filtro para centrifugar. B) Papel filtro des ^o pués de centrifugar con un trozo de tejido cárnico de Yamú.	27
Imagen 4. Muestras cárnicas de Yamú listo para homogenizar y medir pH.....	28
Imagen 7: Imágenes microscopía óptica de barrido del músculo de Brycon amazonicus con magnificación de 4000 X. A) Control de Cultivo; B) Control de Río; C) Cultivo Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; D) Río Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; E) Cultivo Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; F) Río Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; G) Cultivo Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; H) Río Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$, I) Cultivo Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; J) Río Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$	32
Imagen 8: Imágenes de tejido cárnico obtenido del pez “Yamú” <i>Brycon amazonicus</i> teñidas con tricrómico de Masón, con magnificación de 40X. A) Control de Cultivo; B) Control de Río; C) Cultivo Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; D) Río Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; E) Cultivo Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; F) Río Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; G) Cultivo Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; H) Río Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; I) Cultivo Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; J) Río Conservado 61 horas a -8°C . Los gap`s son marcados con flechas, MC es la miocomata y E es el endomesio.....	35
Imagen 5: Perfiles de proteína en extractos de tejido cárnico de Yamú (Brycon amazonicus). Carril 8 perfil proteico Brycon amazonicus proveniente de Río, carril 9 perfil proteico Brycon amazonicus proveniente de cultivo.....	43
Imagen 6: Electroforesis SDS-PAGE al 10%. Se empleó Coomassie coloidal para la tinción y se sembró en cada carril 30 μg de proteína. Imagen 6A muestra los perfiles proteicos de las muestras conservadas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ durante 13 horas. Carril PM.	

Marcador de peso molecular. Carril 1 Muestra de Río. Carril 2. Muestra de Cultivo. Imagen 6B, carril PM. Marcador de peso molecular. Carril 1. Muestra de Río $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ 61 horas. Carril 2. Muestra de Cultivo $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ 61 horas. Carril 3. Muestra de Río $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ 13 horas. Carril 4. Muestra de Cultivo $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ 13 horas. Carril 5. Muestra de Río $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ 61 horas. Carril 6. Muestra de Cultivo $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ 61 horas..... 44

Tabla de gráficos.

Grafica 1. Capacidad de retención de agua (CRA) de la carne de Yamú sometida a diferentes tiempos y temperaturas. Las barras de error corresponden al error estándar. 38

Grafica 2. Fuerza de compresión de la carne de Yamu. Obtenido durante la compresión de la muestra en un 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar..... 40

Grafica 3. Variación de pH en filetes de Yamú conservados a diferentes temperaturas. Las barras de error corresponden al error estándar..... 42

Lista de anexos.

Anexo 1. Tablas ANOVA de las características fisicoquímicas. 49

Anexo 2. Prueba de múltiples rangos (Test de Tukey). 51

Anexo 3. Gráficos de interacción de los factores..... 53

Introducción

En Colombia se han reportado más de 1400 especies distintas de peces de agua dulce (1, 2), sin embargo la mayor parte de la producción piscícola del país (65%) se debe a 2 especies foráneas (Trucha y Tilapia) (3), este fenómeno se debe a que no contamos con la investigación suficiente que permita desarrollar cultivos rentables con especies nativas. No obstante diversos investigadores (4, 5) sugieren que en Colombia existen especies con gran potencial para la acuicultura, dentro de las cuales encontramos el Yamú (*Brycon amazonicus*).

Imagen 1: *Brycon Amazonicus*. Superior: Ejemplar capturado en río. Inferior: ejemplar capturado en sistema de cultivo.



Brycon amazonicus pertenece al género *Brycon*, género conformado por especies dulceacuícolas y que posee más de 40 especies (6). Del género *Brycon*, el *Brycon amazonicus* es la especie nativa que más se ha investigado para la producción acuícola en Colombia (5), debido a que presenta características importantes para esta actividad. Sin embargo gran parte de la producción de esta especie es proveniente de la pesca artesanal en la cuenca del río Meta. Esto se debe a que el desarrollo del cultivo de esta especie es relativamente joven (12 años) (4) y ha tenido que enfrentar problemas técnicos durante su desarrollo. No obstante para el año 2012 la producción piscícola de esta especie llegó a las 261.9 toneladas (7) lo que la ubicó en el quinto lugar en producción.

El pez yamú o *Brycon amazonicus* (8), es la especie más abundante de este género en los Llanos Orientales colombianos. Es una especie que presenta grandes ventajas para desarrollar la piscicultura, debido a sus hábitos alimenticios omnívoros, a la gran eficiencia alimenticia que presenta con bajos niveles de proteína de origen vegetal (4, 9) y a la calidad sensorial de su carne. Según los trabajos de Arias y colaboradores (4), la presencia de esta especie se da en mayor cantidad en los afluentes del río Meta en Colombia, sin embargo se cree que el origen de esta especie es en la cuenca del río Orinoco y su distribución geográfica se da a lo largo de la Amazonía colombiana, Brasileña y Venezolana. Además, el cultivo de Yamú se extiende a lo largo de los departamentos de Meta, Casanare, Arauca y Guaviare y está incursionando con gran aceptación en departamentos como Valle y Antioquia, debido a que las condiciones de cultivo no son muy diferentes a las de otras especies nativas como la cachama (*Piaractus*

brachypomus). Sin embargo sí la industria piscícola desea desarrollar una producción intensiva de este pez, debe afrontar varios desafíos. Sin duda alguna el reto más grande que tiene que superar la industria acuícola de esta especie es la del rápido ablandamiento de la carne cuando esta es sometida a congelación. No se sabe con certeza, cuales son los factores, ni como se dan los mecanismos (10), que generan el efecto de pérdida de firmeza de la carne de pescado. Investigadores como Ando; Suarez; Caballero; Wang (11-14) encontraron en diferentes especies que durante el periodo de rigor mortis, la carne de pescado sufre un ablandamiento drástico, lo que genera un rechazo por parte del consumidor. Se cree que este cambio en la carne, puede ser producto tanto de la degradación de las proteínas miofibrilares (15) como de las tejido conectivo intramuscular (16), debido a la acción enzimática que se presenta durante el periodo post-mortem (10, 13, 14, 17) y que este puede variar su intensidad según la especie y según origen de los peces (11, 13, 18, 19), manejo pre-sacrificio (11, 15, 20, 21), así como del sistema de sacrificio (11).

La textura es uno de los parámetros más importante a la hora de determinar la calidad de la carne de pescado (11, 12), sin embargo esta característica sensorial se ve afectada rápidamente durante el almacenamiento en frío (22), presentándose ablandamiento de la carne, fenómeno que no solo afecta la comercialización directa de pescado, sino que también restringe el uso de esta materia prima, para la elaboración de productos procesados; debido a que la carne ha perdido características físicas, como la capacidad de retención de agua y textura. El fenómeno de ablandamiento de la carne post-mortem en peces y los

mecanismos que lo producen han sido ampliamente estudiados (10, 13, 14, 23-30), sin embargo y a pesar de las investigaciones, el conocimiento acerca de estos procesos es todavía insipiente, especialmente porque la mayoría de los estudios se han realizado en especies altamente comerciales en Europa y Norte América como el salmón (14, 21, 23) y el bacalao (10, 31, 32), pero no existe un registro en especies nativas de Colombia que permita conocer más acerca de este fenómeno.

Debido a que se vislumbra un gran potencial económico con la producción de esta especie que sigue aún sin poder explotarse, por causa de la incapacidad de conservarla en frío durante periodos de tiempo suficientes para comercializarla fuera del departamento del Meta; y a la posibilidad de encontrar respuesta a muchos interrogantes acerca de los cambios post-mortem que sufre el músculo de pescado, se desarrolló esta investigación, la cual tuvo como objetivo determinar la posible causa de la pérdida de textura de la carne de Yamú (*Brycon amazonicus*) por efecto de la conservación en frío, para lo cual fueron analizados peces de Yamú tanto de río como de cultivo.

Objetivos.

General.

Determinar la posible causa de la pérdida de textura de la carne de Yamú (*Brycon amazonicus*) por efecto de la conservación en frío.

Específicos.

- Analizar la degradación de proteínas miofibrilares sufrida por el tejido muscular del Yamú.
- Determinar las alteraciones estructurales y microestructurales de la carne de Yamú sometida a conservación en frío.
- Evaluar las variaciones en características fisicoquímicas que experimentan la carne de Yamú sometida a procesos de conservación en frío.

Planteamiento del problema.

En Colombia se han reportado más de 1400 especies distintas de peces de agua dulce (1), sin embargo la mayor parte de la producción piscícola del país (65%) se debe a 2 especies foráneas (Trucha y Tilapia) (3), este fenómeno se debe a que no se cuenta con la investigación suficiente que permita desarrollar cultivos rentables con especies nativas. No obstante investigadores como (4, 5) sugieren que en Colombia existen especies con gran potencial para la acuicultura, dentro de las cuales encontramos el Yamú (*Brycon amazonicus*).

El Yamú es una especie muy conocida por su potencial para ser cultivada, debido no solo a la gran calidad de su carne, sino también a sus hábitos omnívoros (33), lo que le confiere una gran eficiencia alimenticia (9). Sin embargo la creación del paquete tecnológico, para desarrollar una producción en masa del Yamú sigue en desarrollo, y aunque se han encontrado grandes avances en los temas de reproducción, alimentación y canibalismo (4), existe un problema mayor al que deben enfrentarse los productores y comercializadores de esta especie.

El problema radica en el rápido ablandamiento que sufre el músculo de esta especie al someterse a conservación en frío. No se sabe con certeza, cuales son los factores, ni como se dan los mecanismos (10), que generan el efecto de pérdida de firmeza de la carne de pescado, sin embargo (10, 13, 14) plantean que este fenómeno sucede como producto de la proteólisis y que este puede variar su intensidad según la especie y según el origen de los peces (11, 13, 18, 19), así como del sistema de sacrificio (11).

Hipótesis.

La conservación en frío ($0\pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y $-8\pm 1,0^{\circ}\text{C}$) de la carne del pescado Yamú, acelera el proceso de pérdida de textura, debido a la degradación de las proteínas que dan sustento al tejido cárnico de este pez.

Capítulo 1.

Cambios en la estructura y en las proteínas miofibrilares del músculo del Yamú durante la conservación en frío y el efecto sobre las características físicas.

Resumen

El propósito de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la conservación en frío sobre la carne de Yamú (*Brycon amazonicus*), tras ser almacenados a dos temperaturas diferentes de almacenamiento ($0\pm 1,6^{\circ}\text{C}$ y $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$) y dos tiempos de conservación (13 horas y 61 horas), adicionalmente se realizaron análisis con animales de dos orígenes distintos (cultivo y río). Durante el experimento se analizaron los cambios en el perfil proteico y en la estructura muscular, al mismo tiempo a filetes en fresco y a los previamente almacenados fueron analizadas las propiedades fisicoquímicas de capacidad de retención de agua CRA, pH, textura de la carne y alteraciones microestructurales por medio de microscopía electrónica de barrido y óptica. Los resultados del análisis de las imágenes de la microestructura de la carne mostraron un efecto negativo de la conservación en frío sobre el músculo en general. Los resultados del análisis de la microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, mostraron que el efecto del frío en el músculo se presenta en el tejido conectivo. Por otro lado el perfil proteico no sufrió alteraciones mayores que indiquen que durante la conservación en frío de la carne de Yamú, la degradación de las proteínas miofibrilares fuese responsable de la pérdida de textura. El origen de los peces tuvo efecto significativo en los cambios de textura ($p < 0.05$), mientras que la variación del pH, solo incidió en la textura de los peces

almacenados durante 61 horas; por su parte el tiempo de almacenamiento tuvo efecto significativo sobre las tres características tecnológicas de la carne (CRA, pH y Textura) ($p < 0.05$); por su parte la temperatura de almacenamiento no afectó de manera significativa la CRA ($p > 0.05$), pero si influyó en textura y pH de la carne de Yamú ($p > 0.05$).

Palabras Clave: Músculo de pescado, Yamú, proteólisis, SEM, almacenamiento en frío, textura, capacidad de retención de Agua.

Abstract

The purpose of this work consisted in evaluating the effect of the storage in cold on the flesh of the fish Yamú (*Brycon amazonicus*), using two different storage temperatures (0°C and -8°C) and two different times of conservation (13 hours and 61 hours). In addition, we studied the system with fish from two different resources (cultivated and river). Samples of fresh and stored fillets were used during the experiment; changes were analyzed in the protein profile and in the muscle structure. Microstructural analyses were done by optical and scanning electron microscopy. The physical-chemical properties were determined by the analysis of water retention capacity CRA, pH, protein profile and the texture of the flesh. The results of the microstructure images showed a negative effect on the muscle preservation caused by the storage in cold. The outcome obtained from the analysis of the optical and scanning electron microscopy, showed that the effect of the cold on the muscle affected the connective tissue too. On the other hand protein Profile suffered minor alterations in myosin heavy chain (WHC), troponin (~ 80 kDa) and actin (~ 45 kDa), effect that suggest during cold storage of meat Yamu, the degradation of myofibrillar proteins may be responsible for the loss of texture. The origin of the fish had a significant effect on changes in texture ($p < 0.05$), while the variation of pH, only emphasized

the texture of fish stored for 61 hours. However, the storage time had a significant effect on the three technological characteristics of the meat (CRA, pH and texture) ($p < 0.05$); while, the storage temperature did not affect significantly the CRA ($p < 0.05$), but it influenced the texture and pH of the Yamú meat ($p > 0.05$).

Keywords: Fish muscle, Yamú, proteolysis, SEM, cold storage, texture, water holding capacity.

Introducción

En Colombia han sido reportadas más de 1400 especies distintas de peces de agua dulce (1), sin embargo la mayor parte de la producción piscícola del país (65%) depende de dos especies ícticas introducidas de otras regiones (Trucha y Tilapia) (3), este fenómeno se debe a que en Colombia no se cuenta con la investigación suficiente que permita desarrollar cultivos rentables con especies nativas.

El Yamú (*Brycon amazonicus*) es una especie que presenta potencial para ser cultivada, debido no solo a la calidad de su carne, sino también a sus hábitos omnívoros (33), lo que le confiere eficiencia alimenticia (9), factor importante en la acuicultura. Sin embargo la creación del paquete tecnológico, para desarrollar una producción en masa del Yamú sigue en desarrollo, y aunque se han encontrado grandes avances en los temas de reproducción, alimentación y canibalismo en el alevinaje (4), aún no se conoce acerca de las propiedades tecnológicas y de los procesos que inciden en la calidad de su carne.

La carne del pez Yamú, una vez sacrificado presenta un problema al que deben enfrentarse los productores y comercializadores de esta especie. Este radica en el rápido ablandamiento que sufre la carne de esta especie al conservarse a bajas temperaturas. No se sabe con certeza, cuales son los factores, ni como se dan los mecanismos que la

afectan (10). No obstante, autores sugieren que la pérdida de textura es ocasionada por la acción de proteasas sobre proteínas miofibrilares (15), en especial catepsinas, calpaínas y enzimas hidrolíticas como elastasas y colagenasas (29). Aunque ha sido reconocido que el efecto de las proteasas es posterior e independiente a la pérdida inicial de textura en algunos peces sometidos a refrigeración (10, 34).

Bien es sabido que la textura es un parámetro importante en la determinación de la calidad de la carne de pescado (11, 12), puesto que la pérdida de esta característica, sugiere alteraciones tanto en sus propiedades tecnológicas como sensoriales y microbiológicas. Estudios han demostrado que, la carne de pescado se ablanda después de 24 horas de conservación en hielo (35, 36). Gran parte de estos trabajos han sido realizados en peces marinos (10, 31, 32), en los cuales se ha estudiado el comportamiento post mortem de su carne. Por su parte en especies de peces de agua dulce, se han realizado estudios similares en carpa (*Cyprinus carpio*) (37), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (11) y salmón (14, 21, 23), especies altamente comerciales y muy pocos en el género *Brycon* (2). En la imagen 2 puede observarse el efecto de la congelación en filetes del pescado Yamú.



Imagen 2: Filete de *Brycon amazonicus* conservado durante 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$.

También se ha reportado un incremento sustancial, en el pH, después de conservar filetes de merluza y merluzas enteras a -18°C durante 12 meses (38). Otra propiedad funcional que afecta la carne de pescado bajo almacenamiento en frío ($<0^{\circ}\text{C}$), es la capacidad de retención de agua (CRA), pues esta depende de la humedad y estabilidad de la estructura (39). La alteración de esta propiedad tiene efectos negativos en la comercialización de la carne, pues se perderá peso con el tiempo de almacenamiento y durante la cocción, lo que generará rechazo inmediato por parte de los consumidores, así mismo la posibilidad de utilizar la carne como materia prima para nuevos productos tipo embutidos y carnes reconstituidas, se verá reducida, ya que sus características tecnológicas se afectarán, produciendo pérdidas y problemas en la elaboración del producto.

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar el efecto de la conservación en frío a temperatura constante sobre los cambios en el perfil proteico y en la estructura muscular de la carne de Yamú (*Brycon amazonicus*); y la influencia en las propiedades físicas como capacidad de retención de agua CRA, pH y textura.

Metodología

Material Biológico

Los ejemplares del pez Yamú (*Brycon amazonicus*) que se utilizaron en los análisis fueron obtenidos en el Departamento del Meta. Departamento localizado entre los $04^{\circ}54'25''$ y los $01^{\circ}36'52''$ de latitud norte, y los $71^{\circ}4'38''$ y $74^{\circ}53'57''$ de longitud oeste, con una temperatura variable desde un promedio de 6°C , en el páramo, hasta

temperaturas promedio de más de 24°C en la llanura; un grupo fue obtenido de una finca de producción acuícola ubicada en el departamento del Meta (4°16'17.1"N 73°29'39.0"W, Municipio de Cumaral) (Cultivo); mientras que el segundo grupo se capturó del medio natural (4°32'13.9"N 71°50'47.2"W), Municipio de Puerto Gaitán, Vereda San Miguel - Pescadero) (Río Meta). Los peces (6 de Río y 7 de Cultivo) fueron capturados con la colaboración de pesadores locales sacrificados (por un golpe en la cabeza) y enviados inmediatamente al laboratorio bajo refrigeración en neveras de Poliestireno expandido con hielo empacado en bolsas plásticas, evitando el contacto directo entre el hielo y los pescados. Los pescados fueron lavados con agua fría ($5 \pm 1.5^\circ\text{C}$), eviscerados y se obtuvieron los filetes de cada pescado; de manera aleatoria los filetes de cada origen se asignaron a 3 grupos de 8 filetes cada uno para su posterior análisis. El primer grupo fue conformado por las muestras en fresco, las cuales se analizaron inmediatamente después del fileteado; el segundo grupo corresponde a las muestras almacenadas a una temperatura de $0^\circ\text{C} \pm 1.5$, estas fueron almacenadas en un cuarto frío diseñado para almacenamiento refrigerado de carnes; y por último el tercer grupo pertenece al tratamiento de $-8 \pm 1^\circ\text{C}$, este grupo de muestras se almacenaron en un congelador industrial. Las muestras de fueron analizadas tras el almacenamiento durante 13 y 61 horas.

Extracción de proteínas del tejido muscular de Yamú

La extracción de proteínas se realizó aplicando modificaciones al método propuesto por Cao et al (28). 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 una solución de alta fuerza iónica fría (50 mM buffer fosfato pH 7.5) durante 30 s, posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 5000 g y 4°C por

15 min, el precipitado se suspendió en 4 volúmenes de 50 mM buffer fosfato frío pH 7.5 frío y se repitió el proceso de centrifugado 2 veces más, se descartaron 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. Este procedimiento utiliza soluciones de alta fuerza iónica para precipitar las proteínas miofibrilares altamente iónicas. La mitad de cada uno de los extractos de proteínas se almacenó a -40 ± 0.5 °C, la otra mitad se liofilizó para guardar una contramuestra.

Cuantificación de proteínas

Con el fin de estandarizar la concentración de proteínas de todos los extractos proteicos y de esta manera sembrar en los pocillos de los geles muestras con concentraciones homogéneas, se realizó una cuantificación de cada extracto. La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (40) modificado por Torres (2012) (41). Se tomaron 600 μ L de cada extracto de proteínas y se adicionó el volumen necesario de NaCl al 1% para completar 1 mL, luego se adicionó 1 mL del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA) y se dejó desarrollar el color por diez minutos y se leyó la relación de absorbancias a 450/590 nm. De esta manera se ubicaron los puntos de cada uno de los extractos en una curva patrón de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co, Saint Louis, USA).

Electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

Para la identificación de los perfiles de proteínas miofibrilares de la carne de Yamú, se llevaron a cabo electroforesis en condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE) con un sistema de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, Bio-Rad,

USA). El gel de separación fue del 10%, el gel de concentración fue del 5% (p/v) y el buffer de corrido fue Tris-glicina pH 8,3. En cada pocillo, se sembró 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 patrón de peso molecular de 20 a 210 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 50mL de ácido acético glacial y se completó un volumen 500 mL con agua destilada desionizada.

Análisis de Microscopía.

Con el fin de analizar cambios en la estructura y microestructura muscular en la carne de Yamú almacenada en frío, se realizó un análisis histológico, para tal fin se tomaron muestras a nivel epiaxial (dorso) de los filetes y posteriormente cortadas en trozos de 2 mm x 2 mm x 2mm, de tal manera que se pudiesen observar de manera transversal las fibras musculares. Los trozos se colocaron en viales de 1.5 mL y fueron fijados en 3% formalina tamponada durante 2 días, posteriormente se deshidrataron en una serie graduada de alcohol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 99%) seguido de xileno y finalmente embebidos en parafina. Tres secciones (4µm) se cortaron de cada muestra parafinada y cada sección fue utilizada para cada uno de los análisis. Las muestras se dividieron en 2 grupos iguales, en el primer grupo se analizó la macroestructura por medio de microscopía óptica, mientras que el segundo grupo se utilizó para analizar la microestructura, para lo cual se trabajó con microscopía electrónica de barrido (SEM).

Microscopía Óptica.

Las placas con la muestra extendida fueron teñidas con tricrómico de Masson (MT) (42), con el fin de resaltar las fibras de colágeno. Para este proceso, las inicialmente se lavaron con H₂O destilada y posteriormente fueron inmersas en Hematoxilina de Weigert durante 5 min, después se lavaron con agua corriente y se sumergieron en Fucsina de Ponceau durante 5 min, luego fueron inmersas en ácido fosfomolibdico por 5 min, de esta solución pasaron a una solución Azul de Anilina durante 5-7 min. Finalmente Se analizaron las muestras con un microscopio (Leica DM750 P, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) y se tomaron imágenes con diferentes acercamientos (4X, 10X y 40X).

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

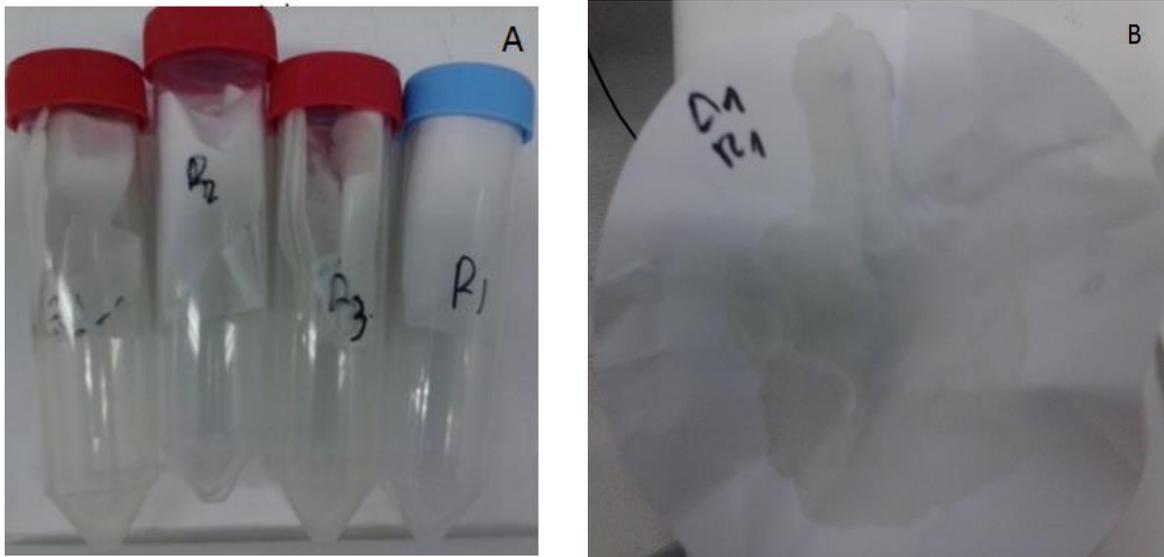
Las muestras para este procedimiento, fueron fijadas en búfer glutaraldehído 3%, posteriormente fueron secadas a punto crítico utilizando el equipo EK 3150 durante 15 min y luego se metalizaron con oro utilizando un equipo (Quorum, Q150R ES), para proceder a la observación con microscopio SEM (FEI, Quanta 200 –r), las muestras de pescado fueron montadas en soportes individuales. Las imágenes obtenidas fueron captadas con magnitudes de 200X, 1000X y 4000X.

Capacidad de retención de agua (CRA) de muestras cárnicas de Yamú

La capacidad de retención de agua (CRA) de las muestras cárnicas de Yamú, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Sánchez-Alonso et al (43) en la cual se tomaron 3g de la muestra y se envolvieron en papel filtro (2 papeles filtro Whatman No. 1, de 110 mm de diámetro) previamente pesados y se introdujeron en un tubo falcón, posteriormente 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.

Imagen 3. A) Porciones de tejido cárnico de Yamú envuelto en papel filtro para centrifugar. B) Papel filtro después de centrifugar con un trozo de tejido cárnico de Yamú.



Análisis de textura de la carne de Yamú

Esta característica se evaluó utilizando un texturómetro electrónico modelo a Stable Micro System texture analyser (TA.XT2, Surrey, England), siguiendo la metodología modificada descrita por Larsson et al., (44), presionando un cilindro de extremo plano (10 mm de diámetro, tipo P / 10) contra el tejido muscular, este método pretende simular la presión ejercida por un dedo índice. Todas las pruebas se hicieron a temperaturas de refrigeración, manteniendo los filetes en hielo. De cada filete se tomaron tres cubos de (2 x 2 x 1,2 cm) encima de la línea lateral.

Se tuvieron en cuenta como variables respuesta la Fuerza máxima de corte (g/g muestra) y área bajo la curva (g*mm). La prueba que se realizó fue un test de Compresión, velocidad antes de la prueba: 1,00 mm/s, la velocidad de la prueba: 1,10 mm/s y la velocidad después de la prueba: 10,00 mm/s, distancia entre la probeta y la muestra: 15,0 mm, compresión de la muestra: 40,0 %. Las condiciones fueron las mismas para cada muestra y se tomaron 7 medidas de cada porción cárnica.

Determinación de pH de las muestras de cárnica de Yamú

Este parámetro se midió con el fin de evaluar siguiendo la metodología descrita por Mohan y colaboradores (2007), (45), en la cual se realizó un homogenizado de las muestras con agua fría ($0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) desionizada 1:6, utilizando un equipo homogeneizador (Ultra-turrax® IKA T-25, USA) a 10000 RPM durante 1 minuto. Una vez obtenido el homogenizado se hizo la lectura de pH utilizando un pH-metro ($17 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) (JENWAY®, JW-3505, Staffordshire, England). Se tomaron 5 medidas a cada homogenizado.

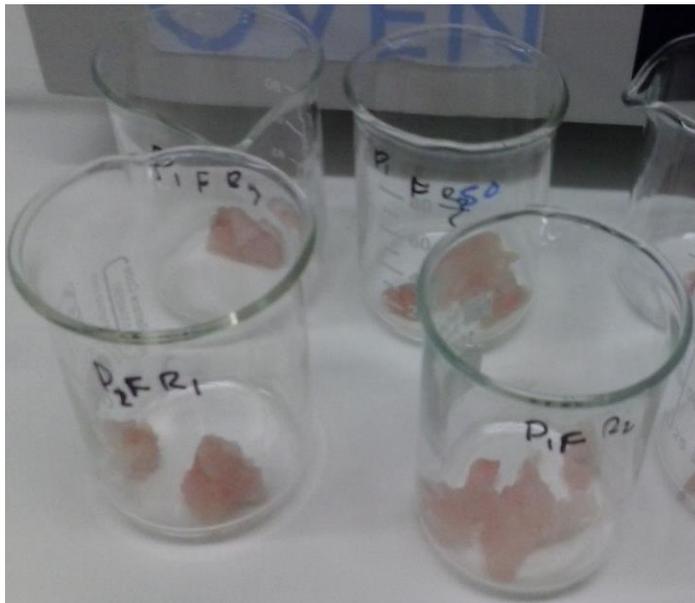


Imagen 4. Muestras cárnica de Yamú listo para homogenizar y medir pH.

Análisis estadístico

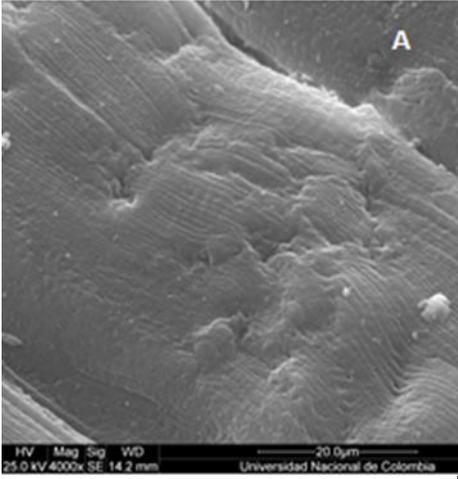
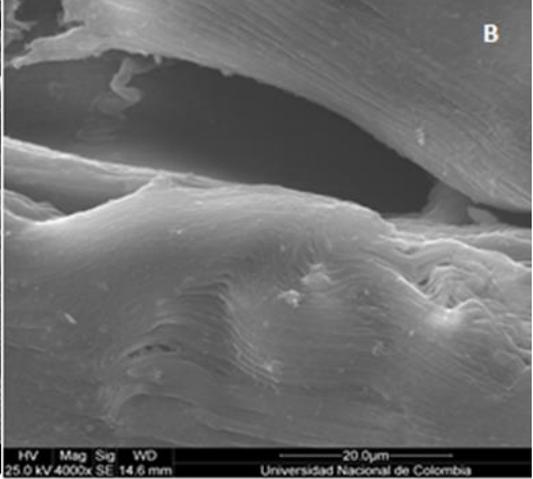
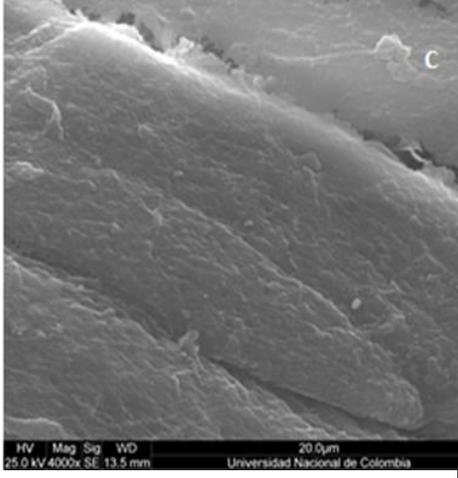
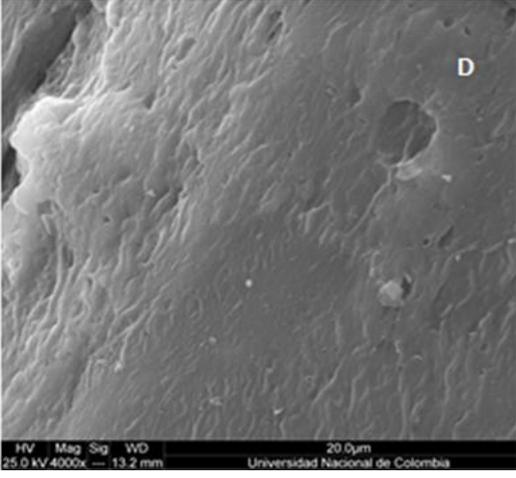
A los datos obtenidos (pH, textura y CRA) se les realizó un análisis de varianza ANOVA, para establecer si existieron o no diferencias entre los niveles de cada uno de los factores y cuando se encontraron diferencias en los niveles de los factores se realizó un Test de Tukey, con el fin de encontrar en cual o cuales de los niveles presento diferencia significativa. Adicionalmente, con el fin de encontrar el efecto de las interacciones entre los factores, se corrió un análisis de varianza multifactorial, en el cual se tuvieron en como variables respuesta la textura (Fuerza de corte), pH y capacidad de retención de agua (CRA); por su parte las variables controladas fueron: El tiempo y la temperatura de almacenamiento.

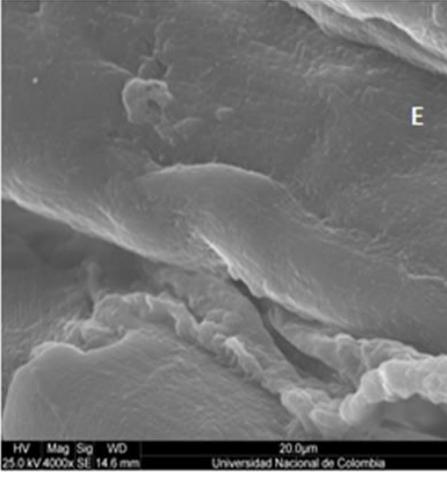
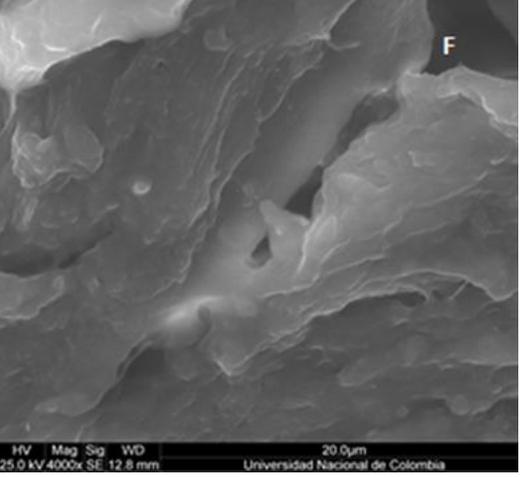
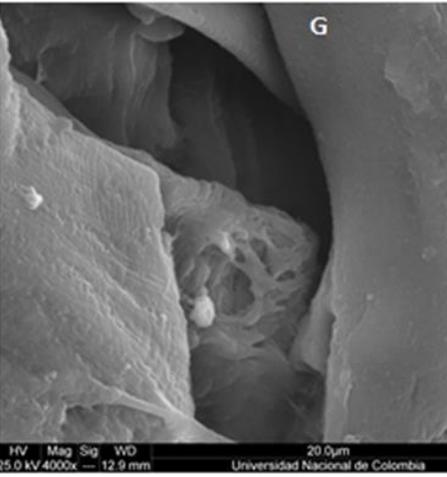
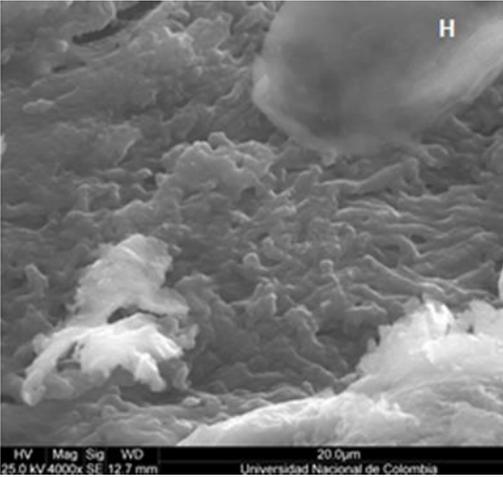
Los datos se corrieron en el paquete estadístico SPSS 19.0 ® (2010).

Resultados y discusión

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

	<i>Brycon amazonicus</i> de cultivo	<i>Brycon amazonicus</i> de ambiente natural
--	--	---

<p>Carne fresca</p>		
<p>Conservación durante 13 horas a 0°C ± 1.5</p>		

<p>Conservación durante 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$</p>		
<p>Conservación durante 13 horas a $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$</p>		

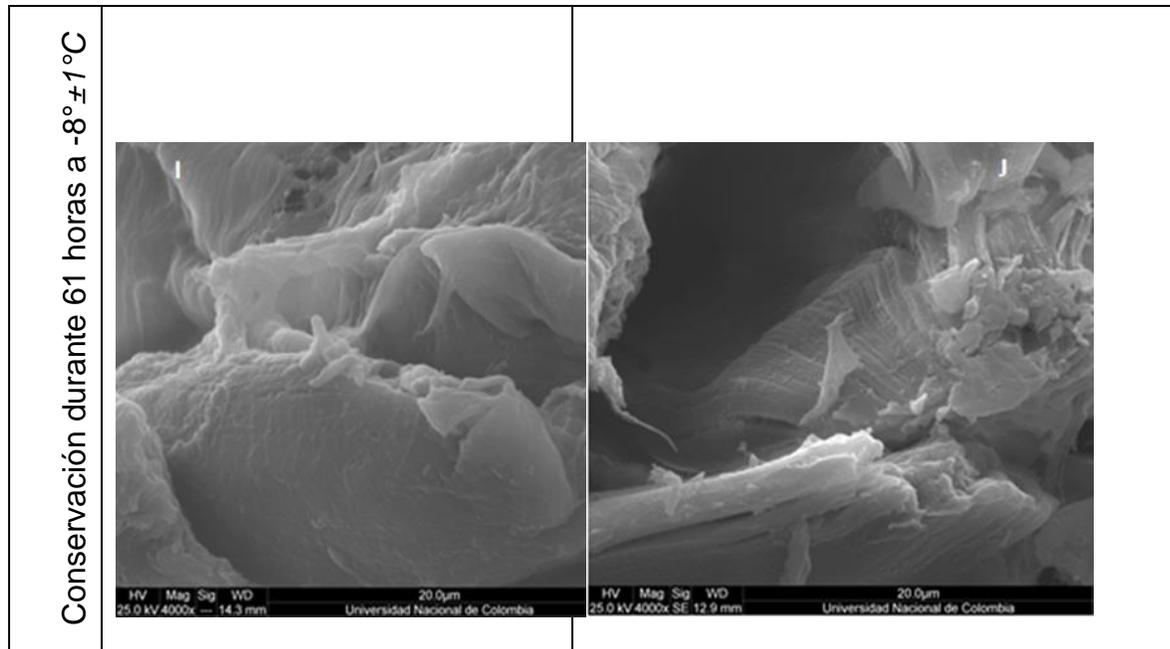


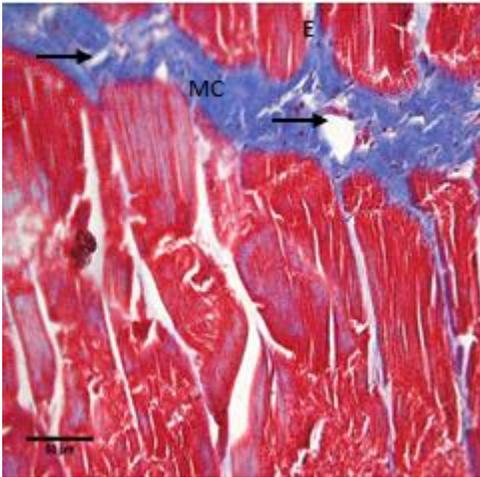
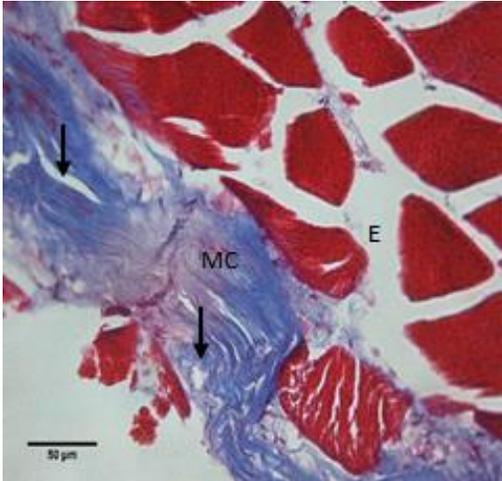
Imagen 5: Imágenes microscopía óptica de barrido del músculo de *Brycon amazonicus* con magnificación de 4000 X. A) Control de Cultivo; B) Control de Río; C) Cultivo Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; D) Río Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; E) Cultivo Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; F) Río Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; G) Cultivo Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; H) Río Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$, I) Cultivo Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; J) Río Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Los análisis de microscopía electrónica de barrido de la carne de yamú como efecto de la conservación en frío de los filetes de peces obtenidos de ambiente natural y cultivo, son presentados en la Imagen 7.

A nivel microestructural, las muestras de fibras musculares de los peces yamú analizados en estado fresco permite observar los mioseptos, miocommata y fibras musculares en estado integral (Imagen 7. A y B). Por su parte en las muestras mantenidas a 0°C durante 13 horas (Imagen 7. C y D) evidenció afectación en la organización de las fibras, la estructura se perdió y se formaron desprendimientos entre miótomos. La muestras conservadas a esta misma temperatura pero por un periodo de 61 horas (Imagen 7. E y F), presentaron mayor pérdida de la arquitectura muscular, la pérdida de colágeno incrementó la separación entre fibras musculares y la estructura es prácticamente amorfa.

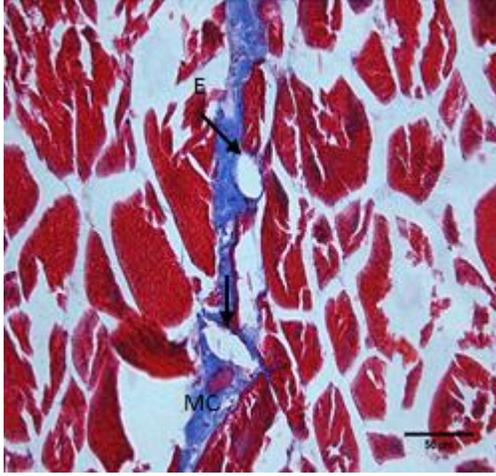
En lo referente a las muestras almacenadas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Imagen 7. G, H, I y J), el daño causado por el frío a la estructura muscular fue mayor, se observaron invaginaciones mucho más pronunciadas y las fibras perdieron la estructura original, como efecto de la degradación de colágeno interfibrilar, este fenómeno se acentúa con el aumento del periodo de almacenamiento bajo condiciones de frío, las muestras conservadas durante 61 horas, presentaron mayor desprendimientos entre secciones y total deformidad de la estructura primaria del músculo. Adicionalmente con esta técnica se evidenció diferencias una leve diferencia entre los peces de cultivo con respecto a los de origen natural. El tejido de estos últimos, presentó un unas fisuras pronunciadas a partir de las 61 horas conservadas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ (Imagen 7, D).

Microscopía óptica

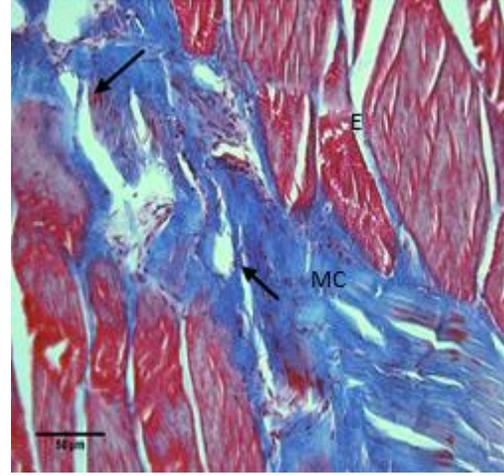
	<i>Brycon amazonicus</i> de cultivo	<i>Brycon amazonicus</i> de ambiente natural
Carne fresca	<p>A.</p> 	<p>B.</p> 

Conservación durante 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$

C.

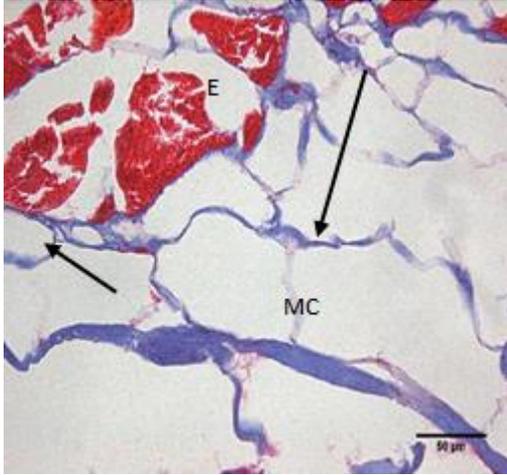


D.

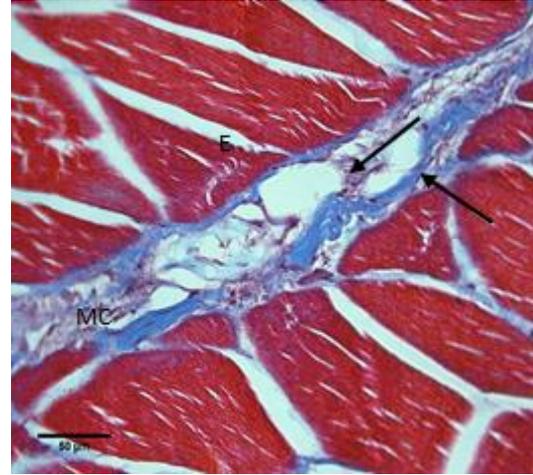


Conservación durante 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$

E.



F.



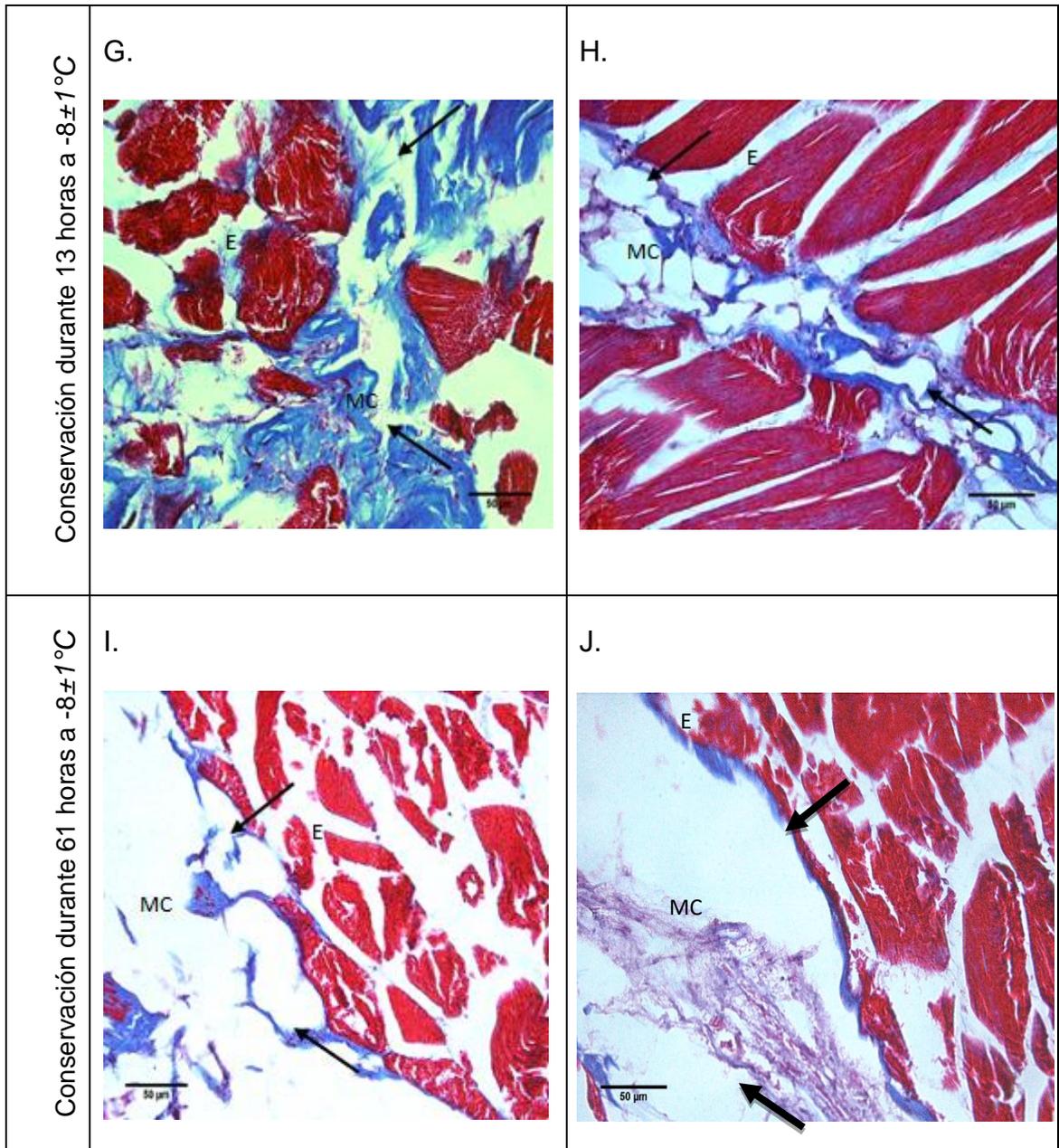


Imagen 6: Imágenes de tejido cárnico obtenido del pez “Yamú” *Brycon amazonicus* teñidas con tricrómico de Masón, con magnificación de 40X. A) Control de Cultivo; B) Control de Río; C) Cultivo Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; D) Río Conservado 13 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; E) Cultivo Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; F) Río Conservado 61 horas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$; G) Cultivo Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; H) Río Conservado 13 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; I) Cultivo Conservado 61 horas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$; J) Río Conservado 61 horas a -8°C . Los gap's son marcados con flechas, MC es la miocomata y E es el endomesio.

En la Imagen 8. Son presentadas las imágenes del análisis realizado con microscopia óptica de luz de la carne del pez “Yamú” (*Brycon amazonicus*) como efecto de la conservación en frío de los filetes de peces obtenidos de ambiente natural y cultivo.

En los cortes de carne fresca se evidencia una estructura compacta de las fibras musculares, con poca separación del endomisio. No obstante en las miocomatas de los animales provenientes del medio natural, además de un leve desorden, se observa un efecto de separación interfibrilar más pronunciado que en la miocomata de los peces de cultivo (Imagen 8. A y B), resultados similares fueron reportados por (13), para filetes de (*Sparus aurata*) conservados a 4°C durante 2 días; y (46) en filetes de Salmón (*Salmo salar* L.) conservado durante un día en hielo.

El efecto de la baja temperatura y del tiempo de almacenamiento en el tejido, se evidencia con la con la formación de áreas degradadas de mayor tamaño. Cuando las muestras fueron conservadas durante 13 horas a 0°C (Imagen 8. C y D), la separación entre el endomisio y los miocitos (flechas) fue un poco mayor comparada con las muestras control, evidenciándose un menor efecto en los peces de río, probablemente debido a que los peces de río eran más viejos factor que incide en la composición de colágeno. Sin embargo cuando el tiempo de conservación en frío fue de 61 horas (Imagen 8. E y F), el tejido de los animales provenientes de cultivo presentó mayor afectación en la estructura histológica. Las miocomatas en estos animales aparecen degradadas casi en su totalidad, mientras que las de los peces de río, aunque presenta también en menor proporción pérdida de colágeno interfibrilar, puede observarse una estructura definida.

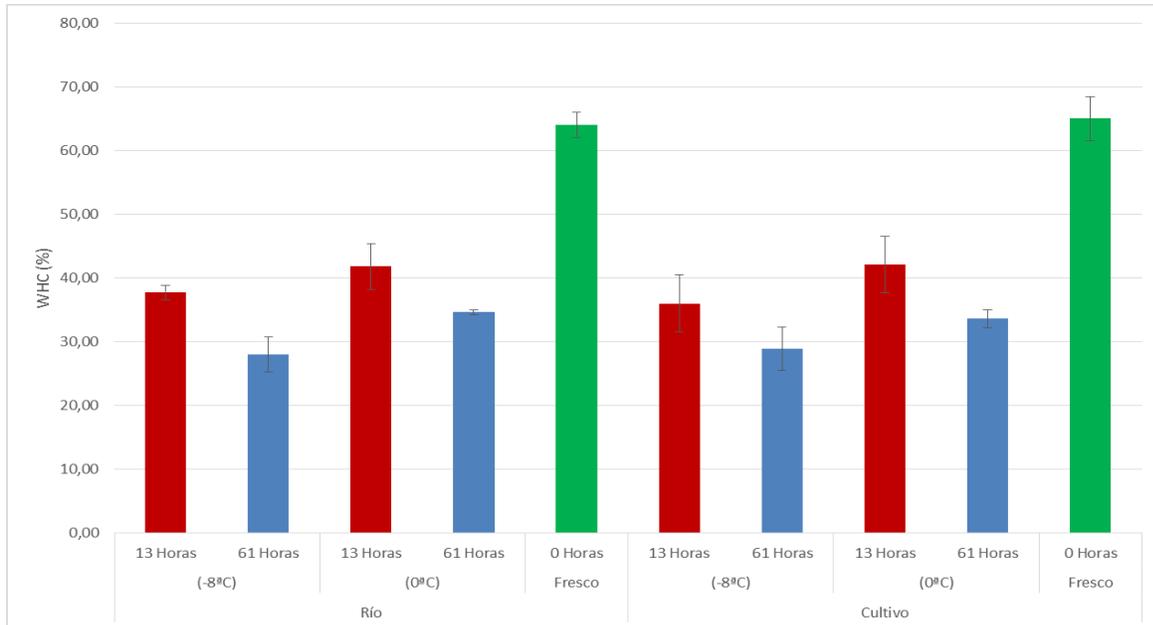
Claramente se evidencia que a menor temperatura la afectación del tejido muscular de *Brycon amazonicus* es mayor. La pérdida de colágeno y formación de espacios

interfibrilares y el tamaño de estos, son efecto de la baja temperatura presentando diferencia significativa entre tratamientos, cuando son comparadas las muestras conservadas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ y las de 0°C durante el mismo tiempo de almacenamiento. Las muestras almacenadas a $-8\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Imagen 5. G, H, I y J) evidencian pérdida del miocomata y en tejido interfibrilar evidencian la formación de espacios en las miocomatas y entre miómeros. A esta temperatura el efecto de la procedencia de los peces es irrelevante, pues el efecto del frío es drástico y de una manera similar en todos los peces. Otros autores reportan degradación similar en filetes de salmón conservados durante 14 días (13).

Este fenómeno de degradación de las miofibrillas de tejido conectivo de la carne de *Brycon amazonicus* sometida a procesos de conservación en frío, es un fenómeno que se ha reportado con anterioridad para diferentes especies de peces conservadas en frío a diferentes temperaturas y durante diferentes tiempos (13, 16, 46, 47) y que es explicado como efecto de la degradación de los proteoglicanos de la matriz, cuya causa es la descomposición estructural de la red de colágeno, generando fallas en la estructura muscular (16).

Capacidad de retención de agua (CRA) de muestras cárnicas de

Yamú



Grafica 1. Capacidad de retención de agua (CRA) de la carne de Yamú sometida a diferentes tiempos y temperaturas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

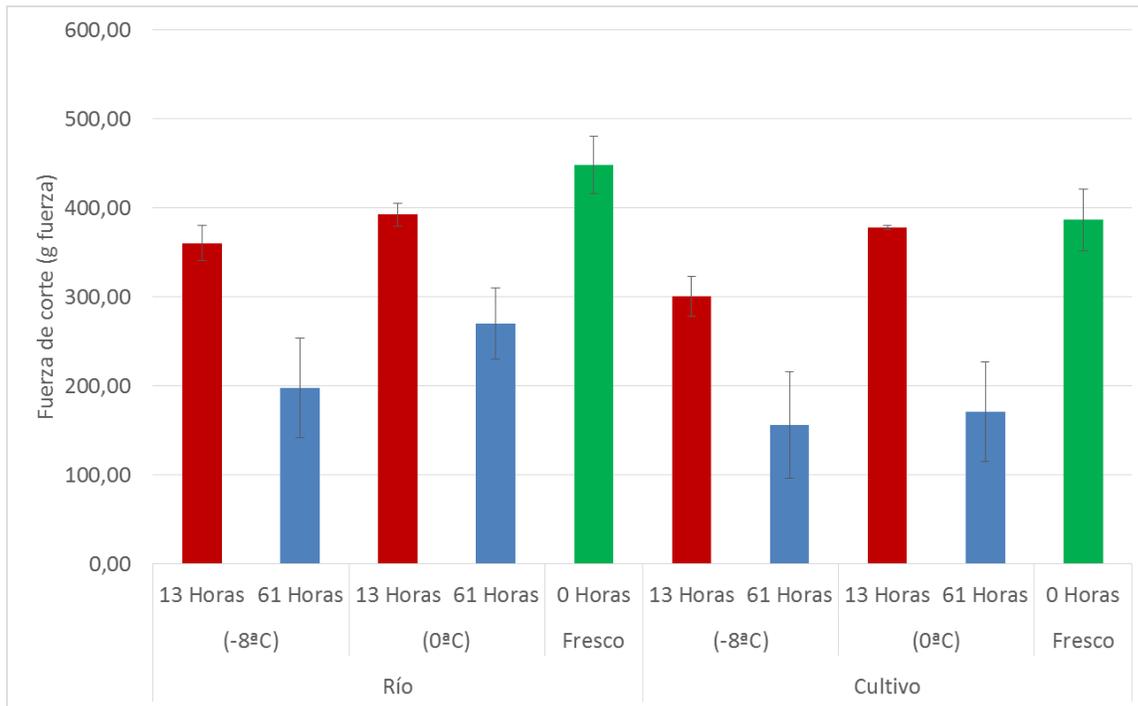
Los valores para la capacidad de retención de agua (CRA) son presentados en la gráfica 1. La CRA de la carne Yamú fue afectada por el tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$) donde el mayor valor después del obtenido para los animales en fresco fue para filetes de peces provenientes de río y almacenados durante 13 horas $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. y el menor valor para filetes de peces de río almacenado durante 61 horas $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. (29.7%). Los valores encontrados difieren de los obtenidos por otros autores, quienes trabajando con filetes de (*Merluccius merluccius*) conservados a $-40^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ durante 25 semanas y demostraron que la CRA de la carne de esta especie aunque reduce su capacidad, esta se mantiene por encima del 40% (43). También se encontraron diferencias en los valores obtenidos en (*Merluccius merluccius*) conservado a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo (0-48 semanas) y encontraron que el efecto del

tiempo de almacenamiento también afecta la CRA de dicha especie (39). El hecho que los valores de CRA reportados por estos autores sean mayores a los obtenidos en nuestra investigación, deja en evidencia que la CRA de la carne de Yamú sufre cambios drásticos cuando esta es sometida a procesos de conservación en frío, especialmente a temperaturas por debajo de los $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. Este fenómeno es causado por las alteraciones en el complejo proteína – agua causadas por la exposición de los grupos alifáticos en la estructura secundaria de las proteínas (48-50). Estos sucesos suceden por efecto de la degradación proteica no controlada con la temperatura de almacenamiento, lo que claramente explica porque solo el tiempo de almacenamiento es causante de la reducción en la CRA, pues a pesar de que los filetes permanecieron a temperaturas inferiores a 0°C , la acción enzimática que hidroliza el complejo proteico que ayuda a retener agua, aún se mantiene trabajando.

Por otra parte, el origen de los pescados (ambiente natural y Cultivo), y el tratamiento de temperatura de conservación no fueron factores que incidieran en la variación en la CRA ($p>0.05$), las interacciones entre los tratamientos tampoco ejercieron efecto sobre la CRA

Gráfica 1.

Análisis de textura de la carne de Yamú



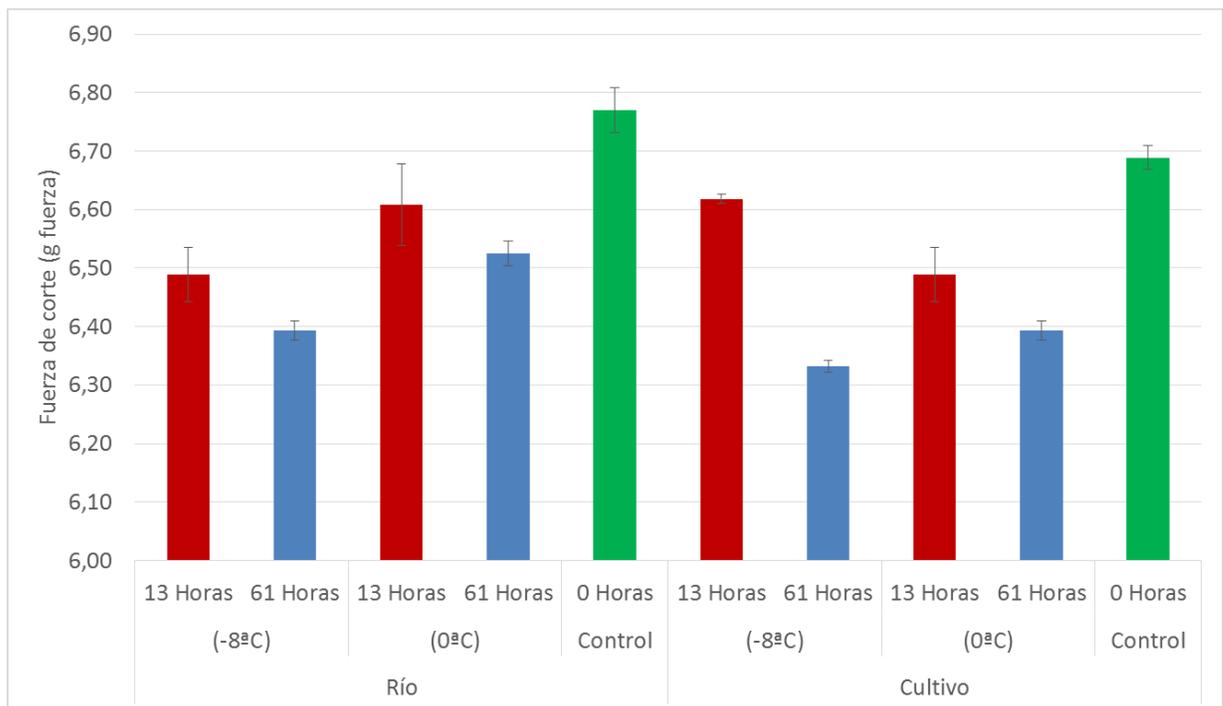
Grafica 2. Fuerza de compresión de la carne de Yamu. Obtenido durante la compresión de la muestra en un 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Los resultados para textura son presentados en la Gráfica 1. Los valores encontrados indican que la textura de la carne de Yamú fue afectada tanto por el origen de los animales como por el tiempo de conservación ($P < 0.05$), asimismo se evidenció un efecto significativo de la interacción de los 3 factores sobre la textura de la carne. El origen solo afecta a la textura cuando el tiempo de almacenamiento llega a 61 horas, a las 13 horas de almacenamiento no hay diferencias significativas ($P > 0.05$) para la textura entre los peces provenientes de cultivo y los provenientes de río.

Los valores obtenidos para la fuerza de compresión en la carne de Yamú, son mayores a los reportados por otros autores que investigaron con (*Oncorhynchus mykiss*) conservada en hielo durante 5 días y encontraron valores entre 32 – 116 (g - fuerza) (51); para (*Brycon cephalus*) después de conservarlo a -3°C durante 12 horas reportaron

valores 96 – 128 (g - fuerza) (52) y para 6 especies distintas almacenadas a 5°C durante 72 horas (11), sin embargo, estos valores son inferiores a los reportados para salmón del atlántico congelado y refrigerado pre y pos rigor mortem, los cuales oscilaron entre 846.4 – 1070.7 (g – fuerza) (53), Pero los datos de la investigación coinciden por los reportados por liu y colaboradores (2013) (54), quienes reportan valores medios de 350 g Fuerza y 430 gramos fuerza para (*Ctenopharyngodon idella*) conservada a -3°C y a 0°C. No obstante, la carne de Yamú muestra un cambio más drástico comparada con los otros autores citados, coincidiendo con otros trabajos (2), lo que indica que la carne de los animales del género *Brycon* puede ser afectada de mayor manera por la conservación en frío que en otras especies ícticas. Esta pérdida de textura está altamente relacionada con la disminución en la CRA, pues al hidrolizarse las proteínas miofibrilares, la estructura que da soporte y rigidez a la carne se pierde y en efecto se reduce su resistencia a la compresión.

Determinación de pH de las muestras de cárnicas de Yamú



Grafica 3. Variación de pH en filetes de Yamú conservados a diferentes temperaturas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Los valores de pH se vieron afectados por dos de los tres factores (Origen y tiempo de tratamiento), así como por la interacción de todos los factores ($p < 0.05$). Sin embargo el origen de los peces tuvo un efecto marcado en la variación del pH de los filetes después de estos haber sido almacenados durante 61 horas.

Los valores obtenidos muestran que el pH de los peces de cultivo está cerca de 6.54 ± 0.07 para conservados a 13 horas y 6.37 ± 0.03 conservados 61 horas. Mientras que para peces de ambiente natural 6.51 ± 0.08 para conservados a 13 horas y 6.48 ± 0.09 conservados 61 horas. Estos valores de pH mostraron una tendencia distinta a la reportada por otros autores (25, 55) quienes trabajando con *Labeo rohita*, y *Mustelus lunulatus* almacenado en hielo durante ocho y dieciocho respectivamente días: sus investigaciones mostraron que el pH de estas especies aumentaba a medida que pasaba el tiempo de almacenamiento; sin embargo en nuestra investigación el pH mostró un descenso en el tiempo para los peces en conservados a las 2 temperaturas de conservación, resultados que muestran una tendencia similar a la reportada para Bacalao conservado a 0 – 5 – 10 – 15°C durante 400 horas (56).

Este descenso del pH sugiere que los pescados fueron sometidos a conservación en frío antes de que empezara el proceso de rigor mortis y el descenso es producto de la conversión de glucógeno a lactato durante la glicólisis postmortem (53).

Los cambios bioquímicos juegan un papel importante para la textura de los filetes de pescado. En particular la acidificación rápida post-mortem de la glucólisis anaeróbica y un pH final bajo se han asociado con suavidad (18, 57), posiblemente debido a la reducción de la fuerza del tejido conjuntivo (58), la desnaturalización de las proteínas y el aumento de la proteólisis (16, 58).

Degradación proteica

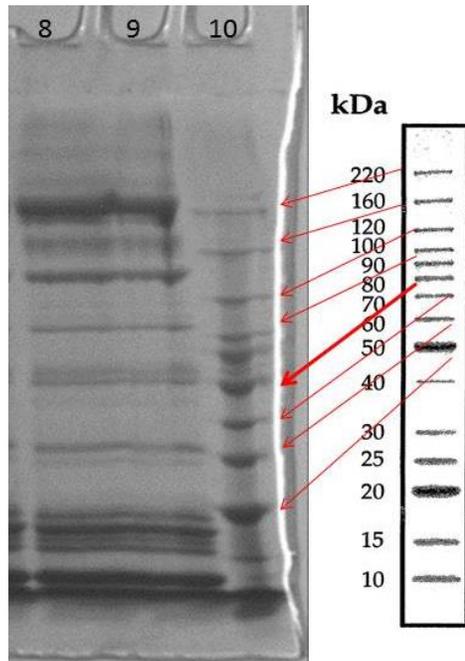


Imagen 7: Perfiles de proteína en extractos de tejido cárnico de Yamú (*Brycon amazonicus*). Carril 8 perfil proteico *Brycon amazonicus* proveniente de Río, carril 9 perfil proteico *Brycon amazonicus* proveniente de cultivo.

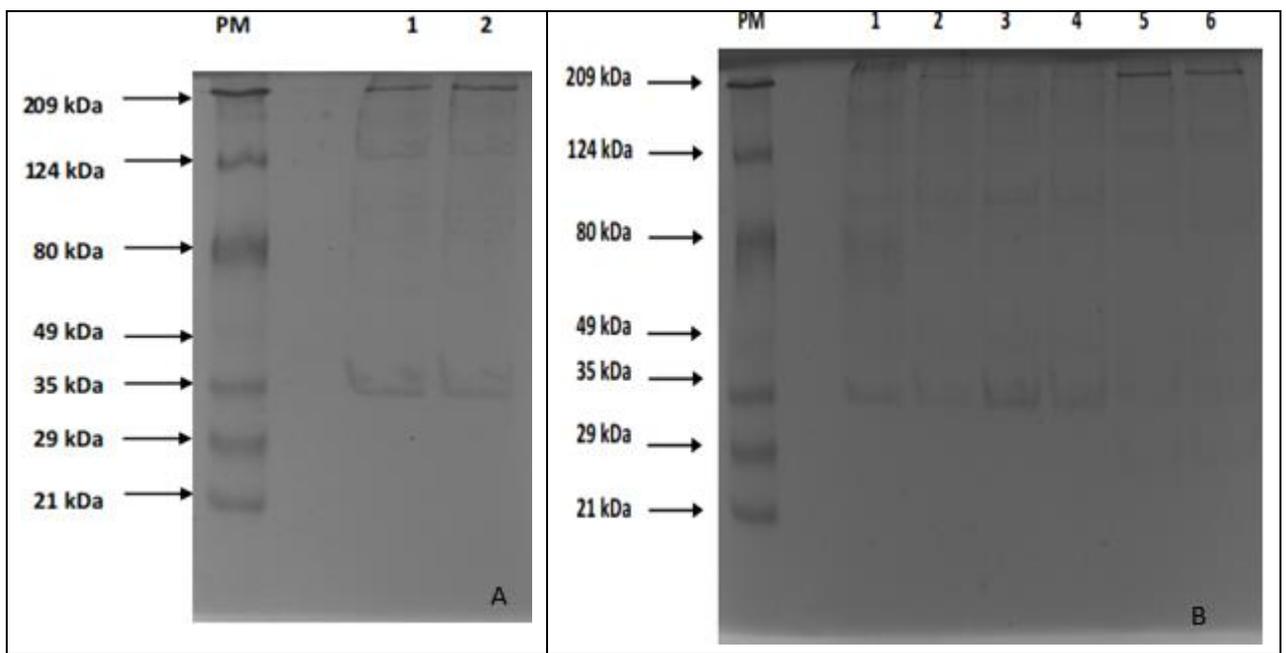


Imagen 8: Electroforesis SDS-PAGE al 10%. Se empleó Coomassie coloidal para la tinción y se sembró en cada carril 30 μg de proteína. Imagen 6A muestra los perfiles proteicos de las muestras conservadas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ durante 13 horas. Carril PM. Marcador de peso molecular. Carril 1 Muestra de Río. Carril 2. Muestra de Cultivo. Imagen 6B, carril PM. Marcador de peso molecular. Carril 1. Muestra de Río $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ 61 horas. Carril 2. Muestra de Cultivo $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ 61 horas. Carril 3. Muestra de Río $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 13 horas. Carril 4. Muestra de Cultivo $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 13 horas. Carril 5. Muestra de Río $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 61 horas. Carril 6. Muestra de Cultivo $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 61 horas.

Los resultados del análisis de perfil proteico determinados por SDS-PAGE 10% (Acrilamida-bisacrilamida) obtenido a partir tejido cárnico en estado fresco de Yamú tanto de río como de cultivo, son presentados en la Imagen 5. Los resultados presentan un patrón de proteínas estables, las bandas son consistentes y no se observan manchas que indiquen fuerte degradación de las proteínas. Tampoco se observan diferencias entre el perfil proteico de los Yamú procedentes de río y de cultivo.

Después de la electroforesis y tinción de las proteínas miofibrilares con azul de Coomassie, se observaron 14 bandas. Los patrones de proteínas son parecidos a los reportados por otros autores (10, 26, 59-61). La identificación de los pesos moleculares, presentó bandas similares a las reportadas por otros autores, miosina de cadena pesada (WHC $\sim 200\text{kDa}$) (28, 62), α -actinina ($\sim 105\text{kDa}$) (10), Actina ($\sim 45\text{kDa}$) (28) y Troponina ($\sim 78\text{kDa}$) (10). Se observa leve degradación de estas proteínas en las muestras que fueron almacenadas en frío (Imagen 6 A), presentándose un mayor efecto en las muestras conservadas durante 61 horas a menor temperatura ($-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$) (carriles 6 y 7). La banda 222 kDa (Imagen 6B. Carril 2), similar a la miosina de cadena pesada se presenta para todos los tratamientos y aunque la intensidad de la banda disminuye encontrándose bandas de menor peso molecular (212,69 kDa; 172,87 kDa; 171,96 kDa; 147,05 kDa; 135,96 kDa; 124,32 kDa y 112,44 kDa) en las muestras conservadas en frío, se puede inferir que no presenta degradación total. En las muestras conservadas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ durante 13 horas, no se observa una banda definida de un peso molecular similar al

de actina (~45KDa), pero si se evidencia la aparición de unas bandas de 34,06 KDa y 30,30 KDa, fenómeno que sugiere una degradación de la actina. Las bandas que representan la α -actinina (~105KDa), dejan de evidenciarse después de haber almacenado por 13 horas en frío los filetes de Yamú (Fig 6A y 6B), sin embargo aparece una banda de peso similar en las muestras de río y cultivo almacenadas a $0^{\circ}\text{C} \pm 1.5$ durante 61 horas y almacenadas a -8°C durante 13 horas, esta banda no tiene la intensidad de las banda de Actina reportadas en la literatura ni la de la encontrada en los perfiles iniciales, lo que indicaría que es un fragmento de otra proteína de mayor peso molecular.

El comportamiento de las muestras proteicas miofibrilares de *Brycon amazonicus* almacenado en frío (0°C y -8°C) fue similar para los animales de río como los de cultivo, aunque al conservarse los filetes por mayor tiempo y a menor temperatura se evidencia la aparición de bandas de menos (71,08 y 64,78 KDa) peso moleculares, lo que sugiere la degradación de algunas proteínas de mayor peso molecular como la troponina (~78 KDa) (Imagen 6B. Carril 3 – 6).

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- El análisis SDS-PAGE evidencio, que los perfiles proteicos de los pescados de río como de cultivo, son similares y el comportamiento después del periodo de almacenamiento en frío fue el mismo, sufren la desaparición de las bandas de ~222 KDa (MHC), ~45KDa (actina) y 70 KDa (troponina), proteínas miofibrilares encargadas de la estructura muscular.
- Las fallas presentadas en la estructura miofibrilar del pescado Yamú, son altamente evidenciables después de 13 horas de almacenamiento tanto a $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$, como a $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$. No obstante las muestras almacenadas a $-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$, presentaron mayores alteraciones en su estructura, evidenciándose rupturas en el tejido conectivo, así como en la microestructura superficial del músculo.
- La carne de los peces de cultivo presentó diferencias importantes en la textura, comparada con la carne de los peces de obtenidos del medio natural (río), evidenciándose así, un mayor ablandamiento del tejido cárnico muscular durante su almacenamiento ($-8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ - $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 61 horas de almacenamiento, diferencia que se evidencia claramente en los análisis de microscopía óptica.
- El pH de las muestras también marcó diferencias entre las muestras que provenían de peces de río y las que provenían de cultivo, estas últimas mostraron un mayor descenso en el pH, aspecto relacionado con fallas en el tejido conectivo, lo que genera un desacople en la estructura muscular que altera las características como la textura y la capacidad de retención de agua. la cuales juegan un papel importante en la calidad de la carne de pescado.

- Los resultados obtenidos, evidencian que las fallas ocurridas en la carne de Yamú durante el almacenamiento en frío, se presentan principalmente en el tejido conectivo. Lo anterior es evidencia que la degradación del colágeno, en la estructura miofibrilar, representada en la pérdida de textura, presencia de “gaping” y malformaciones superficiales, sin embargo la capacidad de retención de agua de la carne Yamú permaneció constante después de las 13 horas de almacenamiento y hasta las 61 horas.
- Aunque después de las 13 horas de almacenamiento en frío de la carne de Yamú, el comportamiento de los filetes tanto de río como de cultivo fue similar, en términos generales se evidencia un mayor efecto de la conservación en frío sobre la pérdida de textura en los filetes de peces provenientes de cultivo, evidenciándose mayor afectación en las miocomatas, mayor ablandamiento y menor pH.

Recomendaciones

- Se recomienda desarrollar un trabajo similar utilizando más niveles en el factor de temperatura y de esta manera establecer una curva de enfriamiento en la que se puedan identificar temperaturas apropiadas para la conservación de la carne de Yamú.
- Se hace importante realizar una investigación, en la que se pueda analizar el comportamiento de diversos tipos de colágeno y de esta manera dilucidar cuál (es) colágenos son los que se están degradando de manera acelerada. Así se encontrará con mayor detalle la causa de este fenómeno de pérdida de textura que sufre la carne de Yamú al ser almacenada en frío.

- También se sugiere que realice un estudio utilizando enzimas (Catepsinas B, D y L, colagenasas entre otras), para determinar si alguna de estas es la que genera las alteraciones de en la carne de Yamú, durante su almacenamiento en frío.

Anexos

Anexo 1. Tablas ANOVA de las características fisicoquímicas.

Análisis de varianza multifactorial para capacidad de retención de agua.

Análisis de Varianza para CRA (%)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
Efecto Principal					
A:Tiempo (Horas)	822	1	822	15	0,0004
B:Temperatura (°C)	2,31053	1	2,31053	0,04	0,8384
C:Origen	4,83126	1	4,83126	0,09	0,7681
Interacciones					
AB	221,67	1	221,67	4,04	0,0511
AC	113,981	1	113,981	2,08	0,1571
BC	102,14	1	102,14	1,86	0,1799
ABC	49,7358	1	49,7358	0,91	0,3465
Residuos	2192,5	40	54,8124		
TOTAL (Corregido)	3376,76	47			

Análisis de varianza multifactorial para textura.

Análisis de Varianza para Textura (g - Fuerza)					
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
Efecto Principal					
A:Tiempo (Horas)	1056350,000	1	1056350,000	76,3	0
B:Temperatura (°C)	32673,800	1	32673,800	2,36	0,1261
C:Origen	75898,700	1	75898,700	5,48	0,0202
Interacciones					
AB	416,7890	1	416,789	0,03	0,8624
AC	47716,500	1	47716,500	3,45	0,0649
BC	146,634	1	146,634	0,01	0,9181
ABC	86160,200	1	86160,200	6,22	0,0134
Residuos	2699710,000	328	13844,700		
TOTAL (Corregido)	4053350,000	335			

Análisis de varianza multifactorial para pH.

Análisis de Varianza para pH					
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
Efecto Principal					
A:Tiempo (Horas)	0,0455317	1	0,0455317	24,37	0
B:Temperatura (°C)	0,00251577	1	0,00251577	1,35	0,2557
C:Origen	0,139101	1	0,139101	74,44	0
Interacciones					
AB	0,0205717	1	0,0205717	11,01	0,0025
AC	0,0416779	1	0,0416779	22,31	0,0001
BC	0,00872214	1	0,00872214	4,67	0,0394
ABC	0,0305416	1	0,0305416	16,35	0,0004
Residuos	0,0523183	232	0,00186851		
TOTAL (Corregido)	0,317497	239			

Anexo 2. Prueba de múltiples rangos (Test de Tukey).

Test de múltiples rangos para Capacidad de retención de agua (%)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Temperatura (°C)	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos
-8°C	13	31,910	1,522	X
0°C	13	40,245	1,522	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
13 Horas - 61 Horas	*	8,33538	8,33538	

Test de múltiples rangos para textura (g – Fuerza) Vs tiempo (Horas)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo (Horas)	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos
61 Horas	273	198,747	11,385	X
13 Horas	273	344,932	12,267	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
13 Horas - 61 Horas	*	146,186	33,006	

Test de múltiples rangos para textura (g – Fuerza) Vs Origen (Cultivo - Río)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Origen	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos
Cultivo	147	252,247	12,338	X
Río	126	291,432	11,307	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
Cultivo - Río	*	-39,185	33,006	

Test de múltiples rangos para pH Vs Origen (Río - Cultivo)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Origen	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos

Cultivo	21	6,459	0,011	X
Río	18	6,532	0,010	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
Cultivo - Río	*	-0,0732083	0,0303787	

Test de múltiples rangos para pH Vs tiempo (13 horas – 16 horas)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo (Horas)	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos
61 Horas	21	6,432	0,011	X
13 Horas	18	6,560	0,010	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
13 Horas - 61 Horas	*	0,128	0,030	

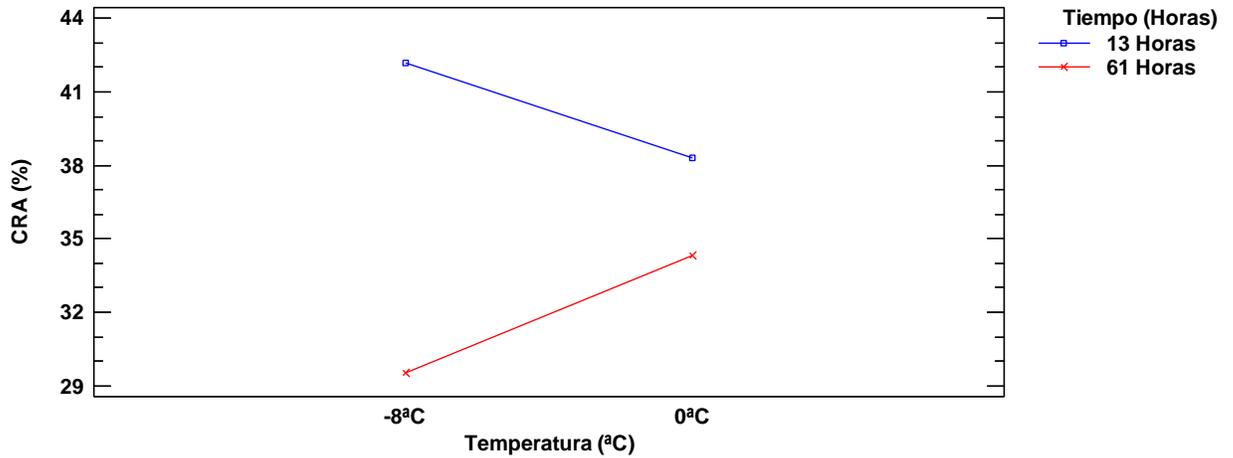
Test de múltiples rangos para pH Vs Origen (13 horas – 16 horas)

Método: 95,0 porcentaje LSD				
Tiempo (Horas)	Cuenta	LS Mean	LS Sigma	Homogeneidad de los grupos
Cultivo	21	6,459	0,011	X
Río	18	6,532	0,010	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites	
13 Horas - 61 Horas	*	-0,073	0,030	

Anexo 3. Gráficos de interacción de los factores.

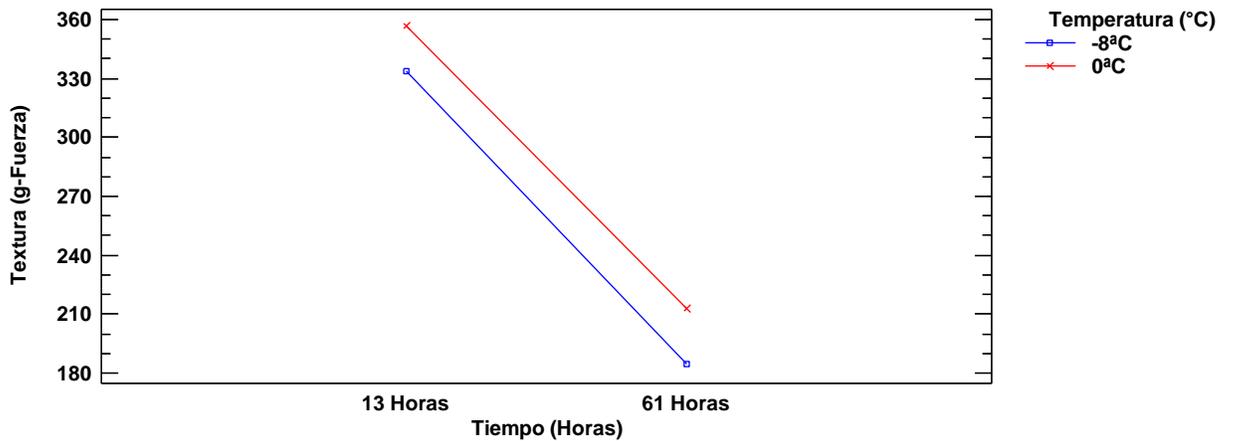
Gráfico de interacción de factores para la variable capacidad de retención de agua.

Capacidad de retención de agua (CRA) Vs Temperatura de almacenamiento (°C)

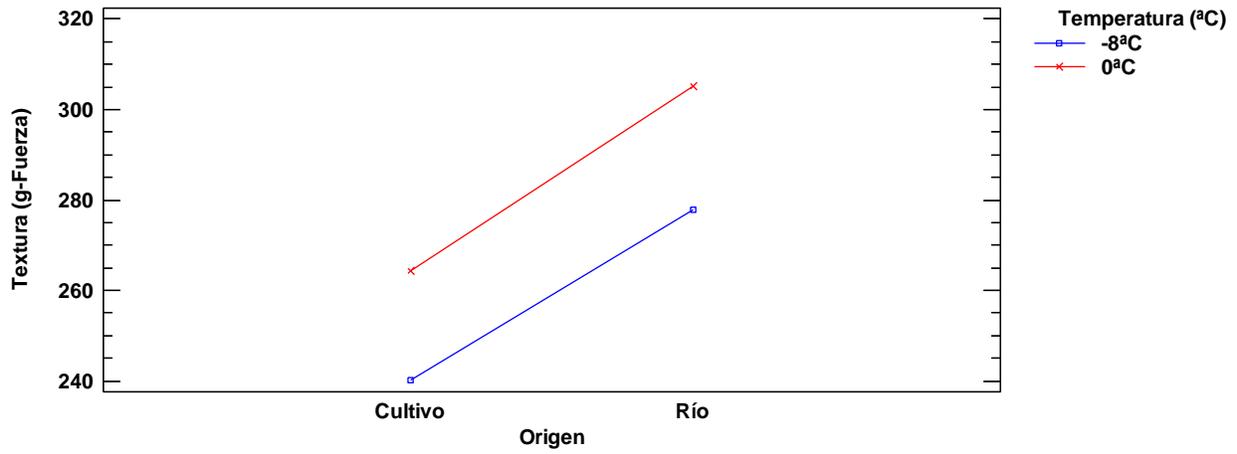


Gráficos de interacción de factores para la variable textura.

Textura Vs Tiempo (Horas)

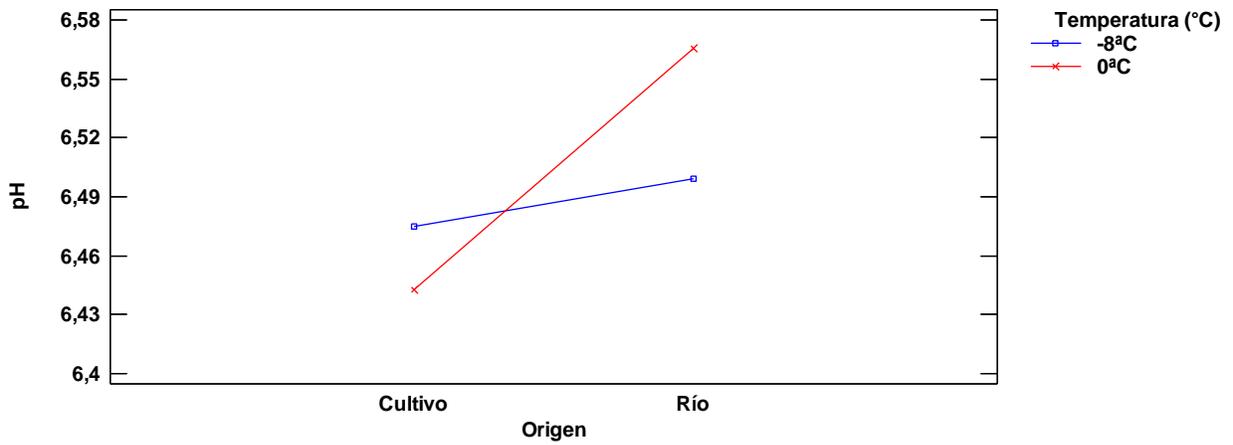


Textura Vs Origen (Cultivo – Río)

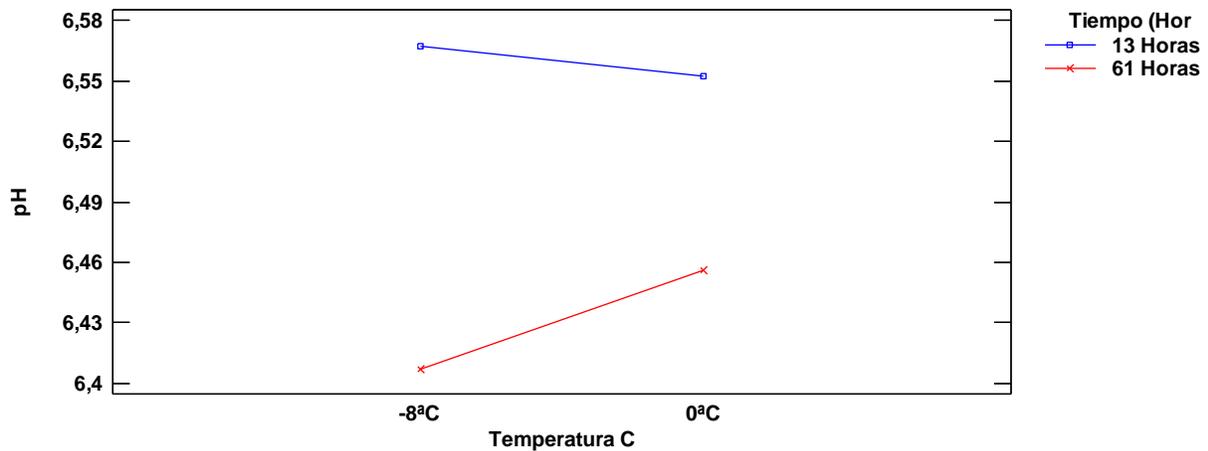


Gráficos de interacción de factores para pH.

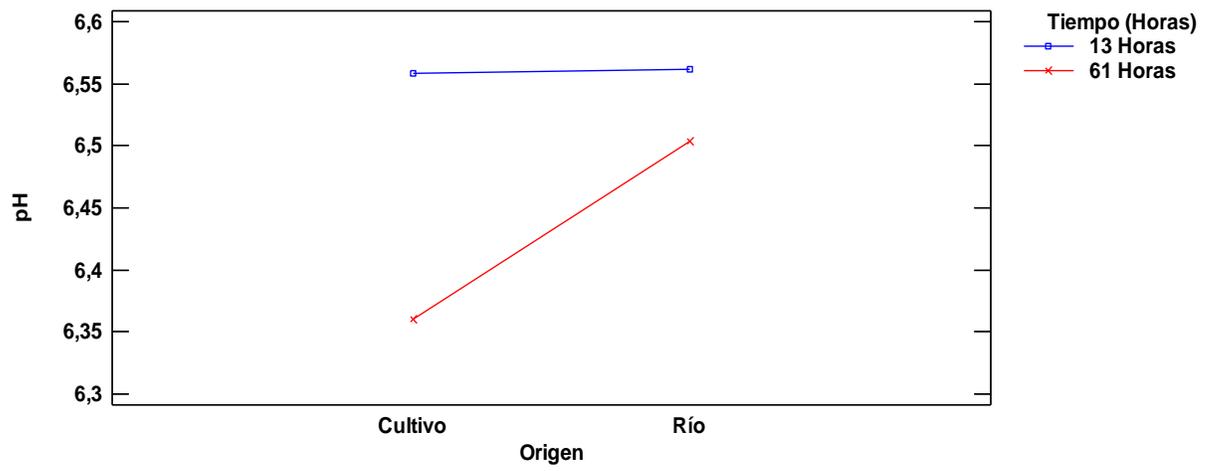
pH Vs Origen (Cultivo – Río)



pH Vs Temperatura (°C)



pH Vs Origen (R{io - Cultivo)



Bibliografía

1. Maldonado J, Vari R, Usma JS. Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia. Biota Colombiana. 2008;9(2):95.
2. Suárez - Mahecha H, Beirão LH, Francisco A, Nakaghi LSO, Pardo-Carrasco SCsIE-Usf-sp, line-height:200%, et al. Chilling effect on the post-mortem texture of the matrinxã fish muscle *Brycon cephalus*. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007;59(4):7.
3. Espinal C, Martínez H, González F. La Cadena De La Piscicultura En Colombia Una Mirada Global De Su Estructura Y Dinámica 1991-2005. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrociencias Colombia 2005. p. 44.
4. Arias J. Estado actual del conocimiento sobre el yamú, *Brycon amazonicus* Revista Colombiana de ciencia pecuarias. 2006;19(2):9.
5. Cruz C, Arias C, Vásquez T, Eslava M. Cultivo de la cachama y el yamú en los Llanos Orientales de Colombia Revista Colombiana de ciencia y tecnología. 2000;18:10.
6. Howes G. Review of genus *brycon*. Bulletin of the British Museum (Natural History). 1982;43:336.
7. CCI CCI-, MADR MDAYDR-. ENCUESTA NACIONAL PISCÍCOLA. Bogotá2012A. p. 16.
8. Spix J, Agassiz L. Selecta genera et species piscium : quos in itinere per Brasiliam annis. Monachil: TVPIS C. W O L F.; 1929.
9. Yudy M. - Evaluación de diferentes proporciones de energía proteína en dietas para juveniles de yamú, *brycon siebenthalae*, (eigenmann,1912). - Orinoquia. 2004;8(1):64 - 76.
10. Ladrat C, Verrez-Bagnis V, Noël J, Fleurence J. 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. 2003;81(4):517-25.
11. Ando M, Nishiyabu A, Tsukamasa Y, Makinodan Y. Post-Mortem Softening of Fish Muscle During Chilled Storage as Affected by Bleeding. Journal of Food Science. 1999;64(3):423-8.
12. Suárez Mahecha H, De Francisco A, Beirão LH, Pardo Carrasco S, Cortés Rodríguez M. PÉRDIDA DE TEXTURA post mortem DE LA CARNE DE PESCADO DURANTE EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO. Acta Biológica Colombiana. 2007;12:3-18.
13. Caballero MJ, Betancor M, Escrig JC, Montero D, Espinosa de los Monteros A, Castro P, et al. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. Aquaculture. 2009;291(3-4):210-6.
14. Wang PA, Vang B, Pedersen AM, Martinez I, Olsen RL. Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. Food Chemistry. 2011;124(3):1090-5.
15. Verrez-Bagnis V, Noel J, Sautereau C, Fleurence J. Desmin Degradation in Postmortem Fish Muscle. Journal of Food Science. 1999;64(2):240-2.
16. Ofstad R, Olsen RL, Taylor R, Hannesson KO. Breakdown of intramuscular connective tissue in cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) related to gaping. LWT - Food Science and Technology. 2006;39(10):1143-54.
17. St-Hilaire S, Hill M, Kent M, Whitaker D, Ribble C. A comparative study of muscle texture and intensity of *Kudoa thyrsites* infection in farm-reared Atlantic salmon *Salmo salar* on the Pacific coast of Canada. Diseases of Aquatic Organisms 1997;31:5.

18. Ang JF, Haard NF. CHEMICAL COMPOSITION AND POSTMORTEM CHANGES IN SOFT TEXTURED MUSCLE FROM INTENSELY FEEDING ATLANTIC COD (*GADUS MORHUA*, L). *Journal of Food Biochemistry*. 1985;9(1):49-64.
19. Ofstad R, Egelanddal B, Kidman S, Myklebust R, Olsen RL, Hermansson A-M. Liquid Loss as Effected by Post mortem Ultrastructural Changes in Fish Muscle: Cod (*Gadus morhua*L) and Salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1996;71(3):301-12.
20. Sigholt T, Erikson U, Rustad T, Johansen S, Nordtvedt TS, Seland A. Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*. 1997;62(4):898-905.
21. Fletcher GC, Hallett IC, Jerrett AR, Holland AJ. Changes in the Fine Structure of the Myocommata–Muscle Fibre Junction Related to Gaping in Rested and Exercised Muscle from King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *LWT - Food Science and Technology*. 1997;30(3):246-52.
22. 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;29:4.
23. Martinez I, Wang PA, Slizyté R, Jorge A, Dahle SW, Cañas B, et al. Protein expression and enzymatic activities in normal and soft textured Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Food Chemistry*. 2011;126(1):140-8.
24. Li X, Li J, Zhu J, Wang Y, Fu L, Xuan W. Postmortem changes in yellow grouper (*Epinephelus awoara*) fillets stored under vacuum packaging at 0°C. *Food Chemistry*. 2011;126(3):896-901.
25. Ocaño-Higuera VM, Marquez-Ríos E, Canizales-Dávila M, Castillo-Yáñez FJ, Pacheco-Aguilar R, Lugo-Sánchez ME, et al. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*. 2009;116(4):933-8.
26. Lund KE, Nielsen HH. PROTEOLYSIS IN SALMON (*SALMO SALAR*) DURING COLD STORAGE; EFFECTS OF STORAGE TIME AND SMOKING PROCESS. *Journal of Food Biochemistry*. 2001;25(5):379-95.
27. Aoki T, Ueno R. Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International*. 1997;30(8):585-91.
28. Cao M-J, Jiang X-J, Zhong H-C, Zhang Z-J, Su W-J. Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*). *Food Chemistry*. 2006;94(1):7-13.
29. Chéret R, Delbarre-Ladrat C, Lamballerie-Anton Md, Verrez-Bagnis V. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*. 2007;101(4):1474-9.
30. Geesink GH, Morton JD, Kent MP, Bickerstaffe R. Partial Purification and Characterization of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Calpains and an Evaluation of Their Role in Postmortem Proteolysis. *Journal of Food Science*. 2000;65(8):1318-24.
31. Wang PA, Martinez I, Olsen RL. Myosin heavy chain degradation during post mortem storage of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Food Chemistry*. 2009;115(4):1228-33.
32. Morrison EH, Bremner HA, Purslow PP. Location of and post-mortem changes in some cytoskeletal proteins in pork and cod muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80(6):691-7.
33. Useche C, Hurtado R, Cala P. Sobre la ecología de *Brycon siebenthalae* y *Milossoma duriventris* (Pices: Characidae) en el río Cafre, Orinoquia. *Revista caldasia*. 1993;17:10.
34. Shigemura Y, Ando M, Tsukamasa Y, Makinodan Y, Kawai T. Correlation of type V collagen content with post-mortem softening of fish meat during chilled storage. *Fisheries Science*. 2003;69(4):842-8.

35. Toyohara H, Shimizu Y. Relation of the rigor mortis of fish body and the texture of the muscle Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish 1988;54:4.
36. Oka H, Ohno K, Ninomuya J. Changes in Texture During Cold Storage of Cultured Yellowtail Meat Prepared by Different Killing Methods Bull Japan Soc Sci Fish 1990;56:6.
37. MA B, Yamanaka H. Studies on Thaw-Rigor in Red Sea Bream and Carpa Muscles Nippon Suisan Gakkaishi. 1991;57:4.
38. Simeonidou S, Govaris A, Varelziz K. Effect of frozen storage on the quality of whole fish and fillets of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and mediterranean hake (*Merluccius mediterraneus*). Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. 1997;204(6):405-10.
39. Sánchez-Valencia J, Sánchez-Alonso I, Martínez I, Careche M. Estimation of frozen storage time or temperature by kinetic modeling of the Kramer shear resistance and water holding capacity (WHC) of hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle. Journal of Food Engineering. 2014;120(0):37-43.
40. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. 1996:236.
41. Torres L GA, Sánchez B IC, Restrepo S LP, Albarracín H W. Estudio de la maduración de carne de cordero empleando electroforesis sds-page. Revista Colombiana de Química. 2012;41:19.
42. Martoja R, Martoja-Pierson M, Grassé PP, Estartús Moncanut M, Durfort Coll M. Técnicas de histología animal. Barcelona: Toray-Masson; 1970.
43. Sánchez-Alonso I, Martínez I, Sánchez-Valencia J, Careche M. Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR. Food Chemistry. 2012;135(3):1626-34.
44. Larsson T, Koppang EO, Espe M, Terjesen BF, Krasnov A, Moreno HM, et al. Fillet quality and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet supplemented with glutamate. Aquaculture. 2014;426–427:288-95.
45. Mohan M, Ramachandran D, Sankar TV, Anandan R. Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*). Process Biochemistry. 2007;42(7):1056-62.
46. Taylor RG, Fjaera SO, Skjervold PO. Salmon Fillet Texture is Determined by Myofiber-Myofiber and Myofiber-Myocommata Attachment. Journal of Food Science. 2002;67(6):2067-71.
47. Papa I, Taylor RG, Astier C, Ventre F, Lebart MC, Roustan C, et al. Dystrophin Cleavage and Sarcolemma Detachment are Early Post Mortem Changes on Bass (*Dicentrarchus labrax*) White Muscle. Journal of Food Science. 1997;62(5):917-21.
48. Herrero AM, Carmona P, García ML, Solas MT, Careche M. Ultrastructural Changes and Structure and Mobility of Myowater in Frozen-Stored Hake (*Merluccius merluccius* L.) Muscle: Relationship with Functionality and Texture. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53(7):2558-66.
49. Careche M, Herrero AM, Rodriguez-Casado A, Del Mazo ML, Carmona P. Structural Changes of Hake (*Merluccius merluccius* L.) Fillets: Effects of Freezing and Frozen Storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999;47(3):952-9.
50. Herrero AM, Carmona P, Careche M. Raman spectroscopic study of structural changes in Hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle proteins during frozen storage. J Agric Food Chem. 2004;52(8):2147-53.

51. Godiksen H, Morzel M, Hyldig G, Jessen F. Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*. 2009;113(4):889-96.
52. Suárez Mahecha H, De Francisco A, Beirão LH PCS, M. CR. Pérdida de textura post mortem de la carne de pescado durante el almacenamiento en frío. *Acta Biológica Colombiana*. 2007;12:16.
53. Einen O, Guerin T, Fjæra SO, Skjervold PO. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture*. 2002;212(1-4):129-40.
54. Liu D, Liang L, Xia W, Regenstein JM, Zhou P. Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at -3 and 0 °C. *Food Chemistry*. 2013;140(1-2):105-14.
55. Jain D, Pathare PB, Manikantan MR. Evaluation of texture parameters of Rohu fish (*Labeo rohita*) during iced storage. *Journal of Food Engineering*. 2007;81(2):336-40.
56. Heising JK, Bartels PV, van Boekel MAJS, Dekker M. Non-destructive sensing of the freshness of packed cod fish using conductivity and pH electrodes. *Journal of Food Engineering*. 2014;124(0):80-5.
57. Kiessling A, Espe M, Ruohonen K, Mørkøre T. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anaesthesia. *Aquaculture*. 2004;236(1-4):645-57.
58. LavÉTy J, Afolabi OA, Love RM. The connective tissues of fish. *International Journal of Food Science & Technology*. 1988;23(1):23-30.
59. Ball D, Johnston I. Molecular mechanisms underlying the plasticity of muscle contractile properties with temperature acclimation in the marine fish *Myoxocephalus scorpius*. *J Exp Biol*. 1996;199(Pt 6):1363-73.
60. Ogata H, Aranishi F, Hara K, Osatomi K, Ishihara T. Proteolytic degradation of myofibrillar components by carp cathepsin L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;76(4):499-504.
61. Swartz DR, Moss RL, Greaser ML. Characteristics of troponin C binding to the myofibrillar thin filament: extraction of troponin C is not random along the length of the thin filament. *Biophys J*. 1997;73(1):293-305.
62. Liu D, Liang L, Xia W, Regenstein JM, Zhou P. Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at -3 and 0 °C. *Food Chemistry*. 140(1-2):105-14.