



UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Aislamiento y Caracterización Parcial de Miosina de Manto
de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

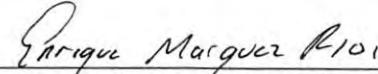
MAESTRO EN CIENCIAS

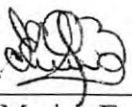
Presenta:

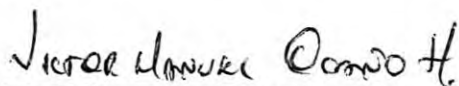
Q.A. Claudia Lizeth Murrieta Martínez

**“Aislamiento y Caracterización Parcial de Miosina de Manto de Calamar Gigante
(*Dosidicus gigas*)”**

Q.A Claudia Lizeth Murrieta Martínez


Dr. Enrique Márquez Ríos
Director de la tesis


Dra. Josafat Marina Ezquerro Brauer
Sinodal


Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera
Sinodal


Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Sinodal

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

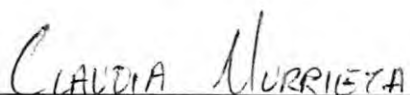
DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

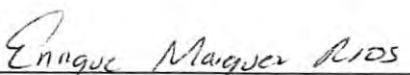
Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Jefe del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente



Q.A Claudia Lizeth Murrieta Martínez
Autor



Dr. Enrique Márquez Ríos
Coordinador del Programa de Posgrado

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora así como al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, lugares en los que he dejado la mitad de mi existencia. Especialmente a Coty, que siempre me saco de dudas y apuros.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por apoyar el proyecto “Estudio de cambios fisicoquímicos, conformacionales y estructurales de las proteínas presentes en concentrados proteicos obtenidos a partir de proteínas musculares del manto de calamar gigante” (clave: 84247).

A mi director de tesis Enrique Márquez Ríos, por su apoyo y compañía en estos años.

Al comité de tesis, Marina Ezquerra, Francisco Javier Cinco y Víctor Ocaño, por sus observaciones, comentarios y apoyo; de igual modo a Wilfrido Torres por su ayuda cuando la necesité.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, a la “patrona” Machuy, Emma, Rosita “shota”, Raquel, “loli mayor” Rueda (Carlos) y “loli menor” Iván, por su compañía y las horas de veneno que hicieron que estos años se pasaran volando. Finalmente a Jesús Encinas (depravado, furrylencio, etc.) por estar siempre ahí, 君はきっと私の光.

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

*Las preguntas que no podemos
contestar son las que más nos*

Nos

ENSEÑAN

a Pensar

PERO

*Si le das a alguien una respuesta,
lo único que obtienes es cierta información.*

*si le das una pregunta,
él buscará sus propias respuestas...*

*Así, cuanto más difícil es la pregunta,
más difícil la búsqueda.
Cuanto más difícil es la búsqueda,
Más aprendemos...*

- Patrick Rothfuss -

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Pesquería del calamar gigante.....	3
Generalidades del calamar gigante.....	5
Composición química del calamar.....	7
Proteínas del músculo del manto de calamar.....	7
Estructura de miosina.....	8
Función de miosina.....	8
El papel de miosina en la gelificación térmica.....	10
El papel de los grupos sulfhidrilo (SH).....	11
Actividad ATPasa.....	11
El papel del pH.....	12
El papel de la hidrofobicidad.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Obtención de la materia prima.....	16
Obtención de miosina.....	16
Cuantificación de proteína.....	17
Perfil electroforético (SDS page y nativa).....	17
Actividad ATPasa.....	17
Hidrofobicidad de superficie (SoANS).....	17
Grupos sulfhidrilos (reactivos y totales).....	18
Calorimetría de barrido diferencial (DSC).....	18
Viscosidad.....	18
Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Perfil electroforético.....	20
Actividad ATPasa.....	22
Hidrofobicidad de superficie.....	24
Grupos sulfhidrilos.....	26
Calorimetría de barrido diferencial.....	29
Viscosidad.....	31
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Distribución de la población de calamar gigante en el Golfo de California.....	4
2	Morfología del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	6
3	Molécula de miosina.....	9
4	Perfil electroforético.....	21
5	Efecto de la concentración sobre la hidrofobicidad de superficie del extracto parcialmente purificado de miosina.....	25
6	Efecto de la concentración de sal sobre la viscosidad del extracto parcialmente purificado de miosina.....	32

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Efecto de la concentración de KCl sobre la Actividad ATPasa del extracto parcialmente purificado de miosina.....	23
2	Efecto de la concentración de KCl sobre los grupos sulfhidrilos.....	27
3	Efecto de la concentración de KCl sobre la temperatura de transición (Tmax) y cambio de entalpía (ΔH) en el extracto parcialmente purificado de miosina.....	30

RESUMEN

Las propiedades gelificantes de los concentrados proteicos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) son inferiores a las obtenidas a partir de otros organismos marinos. Por ello se llevó a cabo el aislamiento y caracterización parcial de miosina extraída del manto de *D. gigas* con la finalidad de elucidar si existe diferencia entre ésta y lo reportado para la proteína aislada de otras especies marinas. Se realizaron análisis químicos (SH, DSC y SoANS), bioquímicos (actividad ATPasa) y físicoquímicos (viscosidad), evaluándose además el efecto de tres distintas concentraciones de sal (KCl) sobre los cambios estructurales de la misma. Los resultados obtenidos sugieren que existen diferencias en el comportamiento de la proteína, así como en su estructura, indicando una mayor flexibilidad de la molécula relacionada directamente con los bajos valores de grupos SH, así como a la elevada actividad que presentó en comparación con lo reportado para otras especies marinas. Lo anterior puede estar relacionado de forma directa con la demandante cantidad de energía que requiere el calamar para nadar. En lo referente a las distintas concentraciones de sal a las que fue sometida la miosina, los resultados indican para el parámetro de viscosidad, que si bien las concentraciones no son suficientes para inducir cambios marcados en su estructura, provocan alteraciones en los cambios conformacionales en la molécula. Las propiedades funcionales de las proteínas del músculo del calamar se pueden atribuir a las propiedades bioquímicas y estructurales detectadas en la molécula de miosina aislada del manto del organismo, las cuales fueron diferentes a las reportadas para otras especies marinas.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante *Dosidicus gigas*, es un recurso abundante y una de las principales pesquerías del país. Su captura representa una importante fuente de empleos e ingresos para los pescadores, principalmente en Sonora, estado que ocupa el primer lugar en producción, aportando un 36.7 % de la producción total nacional (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2011). Como materia prima, ofrece un sin número de ventajas sobre el resto de las especies marinas, como un alto rendimiento post-proceso, bajo contenido de grasa, color blanco de su carne y no contiene espinas ni escamas. Además, posee habilidad gelificante, cualidad importante en el procesado de alimentos, pudiendo ser utilizado para la elaboración de productos gelificados, lo cual pudiera repercutir en un aumento en su consumo en regiones donde aún no es muy popular (Gómez-Guillén *et al.*, 2003).

A diferencia de las distintas especies de peces utilizadas para la obtención de este tipo de productos, las proteínas musculares de los cefalópodos, si bien se agregan durante el calentamiento, generan estructuras con un grado considerable de desorganización, formando geles débiles y poco elásticos (Gómez-Guillén *et al.*, 1998). Esta deficiencia ha sido atribuida a la alta actividad proteolítica que presentan los cefalópodos en comparación con los peces (Stanley y Hultin, 1984; Kolodziejaska *et al.*, 1987; Hurtado *et al.*, 1999). Ya se ha establecido la presencia de proteasas en el manto, presentándose dos picos de actividad máxima a pH 6 y 8 para primavera, y de 6 y 10 para otoño, sugiriendo que las proteasas ácidas y alcalinas siempre están presentes, aunque en distinta proporción según la temporada.

Varios estudios han observado el efecto de la actividad proteolítica sobre la fracción miofibrilar. En este sentido, Konno *et al.* (2003) estudiaron la desnaturalización térmica y el perfil de autólisis de las proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*D. gigas*), encontrando una importante actividad hidrolítica de la miosina por acción de metaloproteasas a pH fisiológico, siendo dichas enzimas inhibidas parcialmente por la adición de EDTA. En otro estudio, Dublan-García *et al.* (2006) reportaron que la actividad proteolítica en el manto de *D. gigas* se presenta tanto a pH neutro como ácido, presentando una temperatura óptima de 35 °C en todo el rango de pH.

En cuanto al perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto de calamar, se ha reportado un intervalo de pesos moleculares de 11 a 395 kDa, abarcando así el peso de una gran variedad de proteasas, concluyendo que las enzimas presentes están compuestas en su mayoría por serina proteasas, metalo proteasas y cisteína proteasas, las cuales mantenían su actividad aún en refrigeración y congelación (Moreno-Martínez *et al.*, 2012).

Por otra parte, Gómez-Guillén *et al.* (2003), al evaluar la acción de las proteasas sobre el músculo del manto de calamar gigante durante 30 días en congelación, observaron un alto grado de hidrólisis, aunque las propiedades funcionales y el comportamiento térmico de las proteínas musculares permaneció sin mayores variaciones. Lo que hace suponer que la actividad proteolítica probablemente no sea la causante de la debilidad presente en los geles obtenidos a partir de esta especie. En otro estudio, Ramírez-Suarez *et al.* (2008) estudiaron los cambios físicoquímicos y funcionales en las proteínas del músculo de manto de calamar gigante durante su almacenamiento en hielo por 15 días. El perfil de textura de los geles mostró valores bajos de dureza (característicos de la especie), no obstante lo atribuyeron a la baja concentración de proteína en la pasta de calamar, únicamente ~10 % de proteína neta (proteína cruda menos nitrógeno no proteico, presente en grandes cantidades en la especie) se encuentra disponible (Cortés-Ruiz, 2007), proponiendo que, si la concentración de proteína pudiera incrementarse, la dureza de los geles se vería mejorada.

Partiendo del hecho de que el calamar puede considerarse como una fuente importante de proteína, pudiendo ser incorporado en diversos productos alimenticios, ya sea como materia base o como suplemento proteico (Palafox *et al.*, 2009) y que, la elaboración de análogos marinos sigue siendo la opción más prometedora, resulta interesante elucidar la causa de la debilidad y falta de elasticidad en los geles de esta especie, con la finalidad de entender, conocer y proponer alternativas viables para atender tal problemática. Se sospecha que la causa pudiera residir en la fracción miofibrilar, por lo cual resulta de gran importancia el estudio de la misma, es decir, el aislamiento y caracterización de la molécula de miosina, por ser la proteína más abundante en la fracción miofibrilar, y además, la principal proteína con propiedades gelificantes. Por lo tanto, la presente investigación centró su atención en el aislamiento y caracterización parcial de miosina.

ANTECEDENTES

Pesquería del Calamar Gigante

El calamar gigante presenta una amplia distribución en la zona del Pacífico Oriental, comprendida a lo largo de las costas de Estados Unidos, hasta las de Chile, siendo las áreas de mayor concentración las ubicadas frente a las costas de Perú y México, concentrándose en este último en la zona del Mar de Cortés (Golfo de California) (Figura 1) (Klett, 1996). La pesquería de esta especie inicia en el año de 1974, siendo los primeros estudios del mismo, realizados al principio de la década de los 80's por Enhardt *et al.* (1983) y Klett (1996), sin embargo, el recurso desapareció repentinamente y la hipótesis más razonable de su desaparición tenía como causa el calentamiento de la corriente de California (el "Niño") (Klett, 1996), de ahí que no haya sido estudiado nuevamente sino hasta que la pesquería resurgió en 1995 (Morales-Bojórquez *et al.*, 1997, 2001).

La elevada abundancia del recurso durante 1996 creó expectativas sobre la pesquería (Hernández-Herrera *et al.*, 1998), pues representó una alternativa rentable que se complementó con la pesquería del camarón del Pacífico Mexicano, ya que cuando los rendimientos de éste disminuían en los meses de diciembre y enero, los barcos camaroneros adoptaron sistemas de pesca que les permitió la captura del calamar gigante (Morales-Bojórquez *et al.*, 2001).

Por otra parte, desde el punto de vista económico, el recurso ha representado una importante entrada de divisas a la pesca artesanal, observándose una recuperación económica importante en la población de Santa Rosalía, B.C.S. por la oferta de empleos directos e indirectos, debido a la alta abundancia del recurso, ya que el principal mercado es la exportación, principalmente hacia el Oriente, donde Corea es el consumidor más importante (Martínez-Aguilar *et al.*, 2010).

Finalmente, hay que tener en cuenta que, si bien en el pasado, el calamar gigante era visto sólo en la parte central del Golfo de California, hoy en día la evidencia indica que ha expandido su rango hacia el norte, pudiendo ser debido al evento del Niño, el cual calentó dichas aguas, de ahí que se haya detectado su presencia incluso en lugares tan remotos como Alaska, sucediendo de forma similar hacia el extremo sur en Chile (Lovgren, 2003; anónimo, 2008; Markaida *et al.*, 2003; Zeldberg *et al.*, 2007).

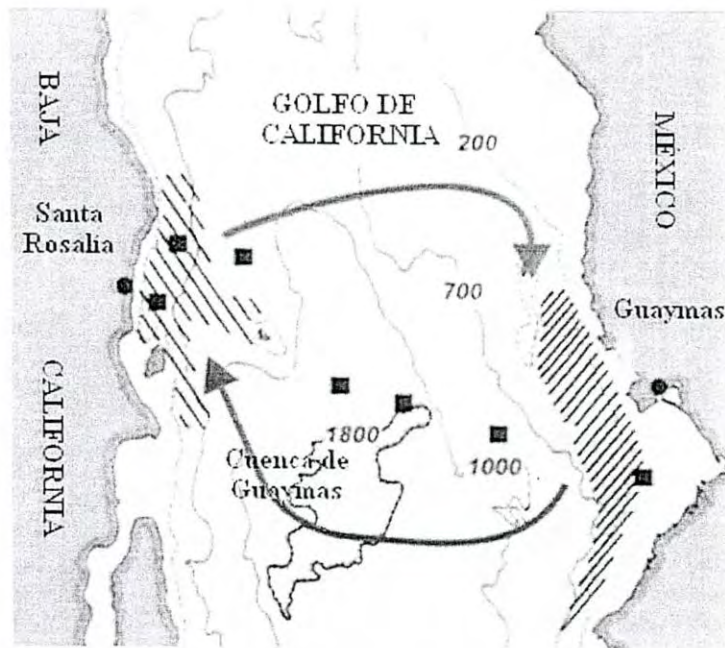


Figura 1. Distribución de la población de calamar gigante en el Golfo de California

Fuente: Markaida *et al.* (2001).

Generalidades del Calamar Gigante

El calamar gigante (*D. gigas*), también conocido como calamar de Humboldt, fue descrito originalmente por D'Orbigny en 1835 y es el de mayor tamaño de la familia *Ommastrephidae*. Posee un cuerpo en forma cilíndrica, pudiendo pesar hasta 50 kg con una longitud de manto de hasta 2 metros, el cual envuelve sus órganos internos. En cuanto a su anatomía general, en un extremo del cuerpo se encuentran sus aletas, mientras que en el lado opuesto se encuentran la cabeza y boca, en la que se puede observar un pico que le permite comer a sus presas. En este extremo también se encuentran los brazos y tentáculos, conteniendo cada uno de éstos de 100 a 200 ventosas con gancho (Kreuzer, 1986; Abugoch *et al.*, 1999) (Figura 2). Al igual que el resto de los cefalópodos, el calamar también cuenta con globos oculares altamente desarrollados y células cromatóforas, las cuales le permiten cambiar de color y brillar para comunicarse (anónimo, 2008; Olsen y Young, 2007).

En lo que al método de nado se refiere, esta especie como el resto de los calamares, se mueve mediante propulsión de jet, moviendo agua a través de su manto, así como por el movimiento de sus aletas. Como dato curioso, el sobrenombre “demonio rojo”, dado por los pescadores, es debido a que, cuando los capturan y traen a la superficie se tornan de un color rojo brillante (anónimo, 2008; Olsen y Young, 2007).

Respecto a su ciclo de vida, se sabe que cuentan con un desarrollo muy rápido, teniendo un promedio de vida de hasta 1 año. El embrión se desarrolla durante 6-9 días, después pasa a un estado paralarvario (longitud de manto de 1-10 mm), el cual se distingue por tener sus dos tentáculos unidos y sobrevivir en la superficie superior junto con el plancton. Ahí crece para convertirse en un ejemplar juvenil (de longitud de manto de 15-100 mm). Posteriormente, el organismo pasa a sub-adulto (longitud de manto de 150-350 mm), para finalmente convertirse en un adulto (Nigmatullin *et al.*, 2001; Staaf *et al.*, 2008).

Durante estas etapas de desarrollo, el organismo sufre diversos cambios en su morfología y alimentación. El calamar gigante es un predador activo que persigue su presa y utiliza las ventosas en sus tentáculos para capturarla y atraerla hacia su pico. Los ejemplares juveniles en cambio se alimentan de copépodos y camarones pelágicos. Conforme el organismo madura, su dieta cambia a peces y otros cefalópodos. Durante sus migraciones verticales nocturnas en las aguas superficiales, los ejemplares adultos se alimentan principalmente de

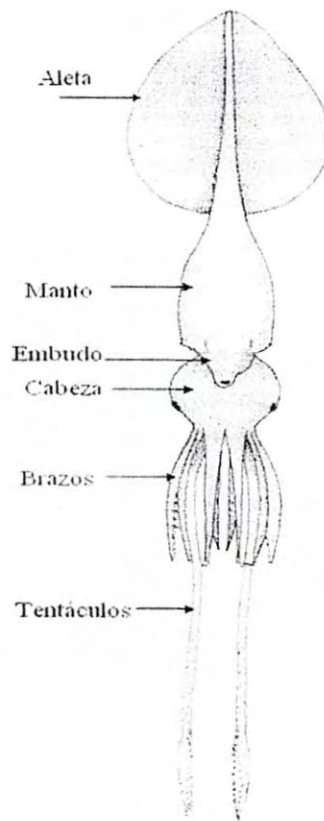


Figura 2. Morfología del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Fuente: Nevárez *et al.* (2002).

linterna, pero pueden alimentarse de una gran variedad de especies pelágicas incluyendo otros calamares y pulpos. Incluso, se sabe que los adultos consumen ejemplares juveniles de su propia especie (Anónimo, 2008; Nigmatullin, *et al.*, 2001).

Composición Química del Calamar

En lo referente a la composición química, tanto el manto como los tentáculos presentan similitudes con la de los pescados magros, conteniendo 75-84 % de humedad, 13-22 % de proteína cruda, 0.1-2.7 % de lípidos y 0.9-1.9 % de minerales. Cabe mencionar que del total de proteína cruda, alrededor del 37 % lo representan los compuestos nitrogenados no proteicos y que los lípidos del manto están compuestos principalmente por fosfolípidos, conteniendo alrededor de 4 % de colesterol (Sikorski y Kolodziejska, 1986).

Proteínas del Manto de Calamar

La fracción proteica del músculo del manto de calamar difiere de la presente en los vertebrados marinos. La fracción estromal, compuesta principalmente de tejido conectivo representa alrededor del 11 % de las proteínas totales, en tanto que en los peces constituye únicamente cerca del 2 %. Esta diferencia se relaciona principalmente con las necesidades fisiológicas del calamar, como por ejemplo, los movimientos necesarios para su locomoción, los cuales son altamente demandantes de energía (Macgillivray *et al.*, 1999; Kier y Curtin 2002; Kier y Thompson, 2003).

Las proteínas de la fracción sarcoplásmica representan alrededor del 15 % del total, mientras que la fracción miofibrilar constituye del 75 al 85 %, siendo miosina la principal proteína presente, seguida de la actina y paramiosina. En el caso particular de la miosina, se ha reportado su baja estabilidad y sensibilidad a la actividad enzimática (Konno *et al.*, 2003), lo cual pudiera ser la diferencia en cuanto a funcionalidad de los concentrados proteicos de manto, en comparación con la presentada por el resto de las especies marinas.

En base a lo reportado en varios estudios, en cuanto a la pobre habilidad funcional del músculo del manto de calamar en comparación al de otras especies marinas, resulta interesante revisar las diferencias en las proteínas musculares, muy probablemente en la estructura de la molécula de miosina, puesto que es el principal componente de dicha fracción.

Estructura de Miosina

La molécula de miosina posee una compleja arquitectura. Es un hexámero de elevado peso molecular de alrededor de 520 kDa, en el que los dos polipéptidos de mayor tamaño poseen una cabeza globular flexible de ~200 kDa y dos pares de cadenas ligeras con tamaños de alrededor de 20-27 kDa, las cuales se cree que son esenciales para la actividad ATPasa, en tanto que la otra funciona únicamente como reguladora (Figura 3). Las cabezas, también conocidas como subfragmento-1 (S1) consisten del dominio motor, el cual hidroliza ATP y une actina, y la región del cuello (o dominio de cadenas ligeras), que funciona como una palanca, es responsable del deslizamiento de filamentos durante el proceso de contracción (Geeves y Holmes, 2005). Esta zona, es decir el subfragmento-1, posee una estructura globular y es soluble en agua, a diferencia del resto de la molécula, la cual es soluble en soluciones salinas (King y Lehrer, 1989; Kato y Konno, 1993).

En cuanto a la porción de la cola, consiste de dos α -hélices enrolladas una sobre otra en una espiral con giro a la izquierda (McLachlan y Karn, 1982; Ozog y Bechet, 1995), presentando un arreglo típico de siete residuos a manera de heptágono, siendo estabilizada en el interior alternando residuos hidrofóbicos y en el exterior alternando residuos de cargas opuestas, lo que hace que esta porción esté altamente cargada (Sellers, 1999; Harrington y Burke, 1972). Es justamente esta carga la que se cree responsable del arreglo en filamentos gruesos a condiciones fisiológicas, así como en fuerza iónica alta (Kristinsson y Hultin, 2003; Takahashi *et al.*, 2005).

Función de Miosina

Las moléculas de miosina son proteínas motor que utilizan la hidrólisis del ATP (función que reside en la fracción globular), así como la capacidad de unir actina para generar fuerza y energía para la movilidad, presentando en el músculo un papel tanto estructural como catalítico (Focant y Huriaux, 1976; Harrington y Rodgers, 1984). La superfamilia de miosina consiste de más de 35 clases, cada una con múltiples isoformas, las cuales poseen diversas actividades celulares (Berg *et al.*, 2001; Foth *et al.*, 2006). No obstante, el camino de reacción para el ciclo de la miosina ATPasa parece conservarse en todas ellas (De La Cruz y Ostap, 2004).

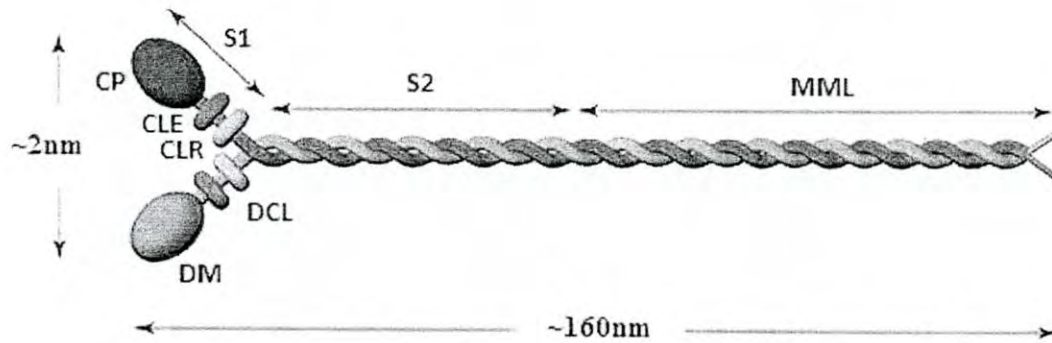


Figura 3. Molécula de miosina. Dónde: meromiosina ligera (MML), cadena pesada (CP), cadena ligera esencial (CLE), cadena ligera reguladora (CLR), dominio de cadenas ligeras (DCL) y dominio motor (DM).

Fuente: Craig y Woodhead (2006).

El funcionamiento general del ciclo es el siguiente: en la ausencia de ATP, la miosina se une fuertemente a la actina. En caso contrario, la unión al ATP induce un cambio conformacional en la miosina, que debilita su afinidad por actina, causando su separación de la misma. Posteriormente, la molécula de ATP es hidrolizada a ADP y fosfato inorgánico (P_i), en tanto que los productos de hidrólisis permanecen unidos a miosina. Finalmente la miosina se une nuevamente a actina y la fuerza que genera la formación de energía acompaña la subsecuente liberación del fosfato, el ADP es liberado y el ciclo se repite una vez más a partir de la unión del ATP (Bagshaw *et al.*, 1974; Geeves y Holmes, 1999; Johnson y Taylor, 1978; Lymn y Taylor, 1971; Rosenfeld y Taylor, 1987).

El Papel de Miosina en la Gelificación Térmica

En lo que se refiere a funcionalidad, las proteínas miofibrilares son un factor importante respecto a los atributos físicos y texturales de productos como la carne y aquellos basados en el músculo de diversas especies (Xiong, 1994; Asghar, 1985). Siendo miosina la principal proteína de la fracción miofibrilar, es responsable de un gran número de propiedades, tales como la capacidad de retención de agua, emulsificación y gelificación, desempeñando el papel principal en la última. Considerando al proceso de gelificación como resultado de la destanuralización proteica que lleva a la formación de interacciones intermoleculares, tanto covalentes como no covalentes, incluyendo puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas (Lee y Lanier, 1995).

En el caso del surimi, el cual es proteína miofibrilar refinada y procesada mediante la remoción de materiales innecesarios como grasa, pigmentos, piel y proteínas sarcoplásmicas solubles en agua, la miosina se encuentra presente en forma del complejo actomiosina, junto a la actina y otras proteínas, pudiendo formar así un gel elástico (Niwa, 1992). Debido a que la actina por sí sola no puede formar un gel fuerte al someterse a un tratamiento térmico, se piensa que las propiedades gelificantes del complejo actomiosina provienen de las porciones de miosina. Aunque ya se ha observado que la unión de actina a miosina modifica sus propiedades gelificantes, los cambios en las propiedades reológicas de miosina y actomiosina al aplicarles temperatura bajo condiciones similares, indican que es miosina quien produce geles de mayor elasticidad (Yasui *et al.*, 1980)

El papel de los grupos sulfhidrilos (SH)

Ya se ha establecido que los grupos SH se encuentran localizados tanto en el interior como en el exterior de las moléculas proteicas, por lo que al darse un cambio en el medio se propicia la interacción del interior con el exterior de la molécula, es así que conforme la estructura se va desplegando, más enlaces disulfuro se van formando (Monahan, German y Kinsella, 1995).

Debido a que la mayoría de los grupos SH (~68 %) en la miosina se encuentran localizados en la región de la cabeza (Lowey *et al.*, 1969), el decremento significativo en los grupos SH no sólo indica la formación de enlaces disulfuro durante la formación del gel, sino que también implica el rol de las cabezas de miosina en la agregación inicial, como ya fue reportado por Taguchi *et al.* (1987) y Chan *et al.* (1993).

Resulta importante además tener en consideración la estrecha relación de los grupos SH con la actividad ATPasa de la molécula de miosina, pues como ya se comentó, un elevado porcentaje de los mismos se encuentra presente en la región de la cabeza de ahí que desempeñen un rol esencial en dicha actividad (Kielley y Bradley, 1956).

Actividad ATPasa

La actividad ATPasa es ampliamente utilizada como indicador de la desnaturalización de miosina de manera cuantitativa (Kimura *et al.*, 1977; Murozuka *et al.*, 1976; Murozuka y Arai, 1976), proporcionando información suficiente en cuanto a la desnaturalización de la porción S-1 (el sitio activo ATPasa reside ahí) (Katoh *et al.*, 1977). Mediante el análisis de la inactivación térmica de Ca^{2+} -ATPasa de las miofibrillas de varias especies de peces, se llegó a la conclusión de que la estabilidad térmica de la miosina es altamente dependiente de la temperatura del agua en la que habitan los organismos (Johnston *et al.*, 1973; Hashimoto *et al.*, 1982). En lo que a la porción de la cola se refiere, los estudios realizados han arrojado resultados similares a los obtenidos en la porción S-1, es decir, dicha porción de miosina aislada a partir de especies de agua fría presentaba mayor inestabilidad en comparación con la obtenida de especies de aguas cálidas (King y Lehrer, 1989; Kato y Konno, 1993).

Por otra parte, en estudios realizados con miosina y miofibrillas de carpa, se encontraron dos fenómenos poco usuales (Kato *et al.*, 1996; Konno *et al.*, 2000 y Tazakawa *et al.*, 2002): el primero de ellos fue la formación de agregados en la porción del cuello de la molécula de miosina, previo a la pérdida de la actividad ATPasa, indicando posiblemente un papel

importante de esta región durante el proceso de agregación de miosina. El segundo fue que la desnaturalización de la cola precede a la de la fracción S-1 (Takahashi *et al.*, 2005).

El papel del pH

Conforme el pH se incrementa o disminuye, alejándose del punto isoelectrico, los grupos ionizables en las proteínas se vuelven altamente cargados, al punto de que las fuerzas de repulsión causan que la molécula se despliegue (Dill y Shortle, 1991). Anteriormente se creía que este desplegamiento se daba de manera aleatoria, no obstante, reportes recientes sugieren que un gran número de proteínas sólo se despliega parcialmente (principalmente a pHs bajos), reteniendo así gran parte de su estructura secundaria y con la pérdida de la mayoría de su estructura terciaria (Goto y Fink, 1989; Goto *et al.*, 1990; Fink *et al.*, 1994).

Hultin y Kelleher (1999, 2000), han reportado que el desplegamiento proteico a valores de pH ácidos provoca disociación en la región de la cola de miosina debido a la repulsión electroestática, aunque esto no se observa en condiciones alcalinas. Lo anterior contrasta con estudios llevados a cabo en miosina de conejo (Ozog y Bechet, 1995; Lowey, 1965; Gershman *et al.*, 1966; Gershman *et al.*, 1969; Szuchet y Zobel, 1974), en los cuales se indicó que la estructura helicoidal prácticamente no era afectada al variar el pH del medio.

En lo referente a la región globular, Hultin y Kelleher (1999, 2000), establecieron que ambas disoluciones (ácida y alcalina) conducen a cambios conformacionales significativos, sugiriendo que la fracción de la cabeza toma una configuración similar a un glóbulo fundido. En tanto que en el reajuste de pH hacia la neutralidad la cadena pesada toma una estructura similar al estado nativo, con cierto grado de enrollamiento en la cola, mientras que la cabeza globular es menos compacta, más hidrofóbica y estructuralmente menos estable (Ramírez de León *et al.*, 2013).

Kristinsson y Hultin (2003) estudiaron la miosina de bacalao, observando que a pH ácido la miosina se encuentra completamente disociada y que durante el ajuste a la neutralidad las cadenas pesadas se re-asocian, en tanto que las ligeras no lo hacen, mientras que a pH alcalino las cadenas pesadas permanecen intactas y sólo parte de las cadenas ligeras sufre disociación.

El papel de la hidrofobicidad

Varios estudios sugieren que las interacciones hidrofóbicas están relacionadas en la gelificación inducida por calor de la miosina (Niwa *et al.*, 1981, 1989) y un cambio en las mismas es un prerequisite para el proceso (Wicker *et al.*, 1986). Chan *et al.* (1992) reportaron que la agregación térmica de miosina de peces coincidía con un incremento en la hidrofobicidad de superficie de la misma y era afectada por la temperatura.

Es entonces que, si la participación de la interacción hidrofóbica es un prerequisite para la formación de grandes agregados de miosina y/o un gel dúctil y cohesible, podría suponerse que cualquier factor que afecte la hidrofobicidad de superficie de las moléculas de miosina puede afectar las propiedades reológicas del gel, de ahí que resulte de importancia tanto la temperatura como la concentración de sal con la que se trabaja, ya que de éstas depende la desestabilización del centro hidrofóbico, así como la fuerza de dichas interacciones en la proteína (Gill *et al.*, 1992).

Como se ha comentado, la miosina varía ligeramente en su comportamiento de una especie a otra, lo cual es de esperarse, considerando que, si bien, su función es la misma, las condiciones en que llevan a cabo dicha función no lo son. En el caso particular del calamar, es de esperarse alguna diferencia en la molécula, debido al elevado requerimiento energético necesario para su nado, el cual consiste de un sistema de propulsión a chorro, en el que participan principalmente las fibras musculares centrales, siendo sometidas a presiones elevadas cuando la cavidad del manto se llena de agua para posteriormente ser liberada a presión (De la Fuente-Betancourt, 2005).

HIPÓTESIS

La miosina extraída a partir del manto de calamar gigante *Dosidicus gigas* presenta diferencias químicas, bioquímicas y fisicoquímicas con respecto a la de otras especies marinas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar parcialmente la molécula de miosina del músculo del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

Objetivos particulares

1. Aislar la molécula de miosina del manto de calamar gigante.
2. Caracterizar química, bioquímica y fisicoquímicamente y de manera parcial a la miosina aislada del manto de calamar gigante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Materia Prima

Para la realización del presente trabajo se utilizó calamar gigante (*D. gigas*) capturado en las costas de Guaymas, Sonora. Los ejemplares fueron colocados en un arreglo hielo-organismo-hielo y transportados a las instalaciones del Laboratorio de Marinos en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, en donde fueron eviscerados y almacenados a una temperatura de -20 °C hasta su utilización.

Obtención de Miosina

La extracción de miosina se realizó a partir del músculo del manto de calamar gigante *D. gigas*, según el método propuesto por Raghavan y Kristinsson (2007) con algunas modificaciones. Se partió del manto, el cual fue homogeneizado empleando para ello un homogeneizador de tejido (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK). El homogeneizado fue mezclado con 10 volúmenes de la solución A (cloruro de potasio 0.1 M, fenil metil sulfonil fluoruro 1 mM, azida de sodio 0.01 %, buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) y homogeneizado por 1 min. Posteriormente, se dejó en reposo durante 60 min a 4 °C para ser centrifugado a 10000 g por 15 min a una temperatura de 4 °C (Sorvall stratos, modelo Biofugue).

El precipitado fue suspendido en 5 volúmenes de la solución B (KCl 0.45 M, β -mercaptoetanol 5 mM, acetato de magnesio 0.2 M, ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-tetracético 1 mM, buffer Tris maleato 20 mM, pH 6.8), mezclado con adenosina trifosfato a una concentración final de 10 mM, y dejándose reposar durante 90 min a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 10000 g por 15 min y el sobrenadante fue diluido lentamente con 10 volúmenes de agua destilada y mantenido a 10 °C durante 60 min, el cual se centrifugó a 12000 g por 10 min. El pellet se resuspendió en la solución C (KCl 0.5 M, β -mercaptoetanol 5 mM, buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) para dejarse en reposo 10 min a 4 °C y posteriormente diluirse con 2.5 volúmenes de bicarbonato 1 mM y MgCl₂ 10 mM. Esta solución se incubó por 12 h a 4 °C. Finalmente, se centrifugó a 22000 g por 15 min, y el extracto obtenido se consideró como el extracto semipurificado de miosina, el cual fue resuspendido en buffer Tris-Hcl 20 mM con

una concentración de KCl de 0, 1 y 3 % respectivamente, obteniendo así tres tratamientos. Todas las soluciones fueron mantenidas a 10 °C.

Cuantificación de Proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford (1976), el cual se basa en la unión del colorante azul de Coomassie a la proteína. Se realizó una curva de calibración de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μL en base a una solución estándar de albúmina de suero bovino (1 mg/mL).

Perfil Electroforético (SDS-PAGE y nativa)

Para determinar la pureza de la miosina extraída se realizó un perfil electroforético, cargando 13 μg de proteína a gel de acrilamida al 8 %. En el caso del SDS-PAGE, tanto el gel como el buffer muestra contenían SDS y la muestra fue calentada a 100 °C, disociando así la proteína en sus unidades polipeptídicas. Las bandas fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.05 % y desteñidas en una solución de metanol al 40 % y ácido acético al 7 % (Kelleher *et al.*, 2004), e identificadas de acuerdo al método reportado por Stefansson y Hultin (1994), utilizando como marcador una mezcla de proteínas estándar de amplio rango (Bio-Rad). Para el sistema nativo se realizó el mismo procedimiento pero evitando el calentamiento de la muestra durante su preparación y sin SDS tanto en el buffer muestra como en el gel.

Actividad ATPasa

El estudio de la actividad ATPasa se llevó a cabo según el método reportado por Riebroy *et al.* (2009) con modificaciones. En este método se midió espectrofotométricamente el fosfato inorgánico liberado por la miosina, a 363 nm. Se definió la unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por min.

Hidrofobicidad de Superficie (SoANS)

La hidrofobicidad de superficie se midió utilizando el método de fluorescencia extrínseca reportado por Lin y Park (1998) con algunas modificaciones, utilizando 1-anilino-8-naftalensulfonato (ANS) a una concentración de 10 mM, preparado en buffer de fosfato de

sodio 0.1 M, pH 7.5. Se utilizó una solución madre de miosina con una concentración de 12.73 $\mu\text{g/mL}$, la cual se diluyó a 12, 10, 9, 8 y 7 $\mu\text{g/mL}$ de miosina en 2 mL con buffer Tris-HCl 20 mM (concentración de KCl de 0, 1 y 3 %). La muestra fue excitada a 374 nm y el espectro de emisión se midió a 485 nm. Se utilizó como blanco una mezcla de ANS y buffer Tris-HCl (con la fuerza iónica respectiva a cada tratamiento). El índice de hidrofobicidad de superficie (S_o) se obtuvo de la pendiente del gráfico intensidad de fluorescencia vs concentración de proteína.

Grupos Sulfhidrilos (Reactivos y Totales)

Para determinar los sulfhidrilos reactivos se utilizaron 2.25 mL de una solución de miosina (16.72 $\mu\text{g/mL}$) y se le adicionaron 15 μL del reactivo DTNB [(5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)] a una concentración de 10 mM. La reacción se llevó a cabo a 5 °C registrando la absorbancia a 420 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de 13,600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Lin y Park, 1998).

Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC)

La desnaturalización y transición térmica de miosina se estudió mediante calorimetría de barrido diferencial utilizando un calorímetro (DSC-8000 Perkin-Elmer). Se prepararon muestras de miosina con una concentración de 15 mg/mL en buffer Tris-HCl 20 mM (concentración de KCl de 0, 1 y 3 %) y se degasificaron a 5 °C al vacío por 7 min. La transición térmica de la miosina se estudió en un rango de 2 a 100 °C con una rampa de temperatura de 10 °C/min. Como referencia se utilizó una capsula vacía (Visessaguan *et al.*, 2001).

Viscosidad

Para evaluar la viscosidad se utilizó un reómetro Anton Paar modelo MCR 102. Las muestras de miosina fueron ajustadas a una concentración de proteína de 1.35 mg/mL en buffer Tris-HCl 20 mM (concentración de KCl de 0, 1 y 3 %). Se utilizaron 19 mL de la solución de miosina. Se hizo un barrido de temperatura de 10 a 70 °C con una rampa de 2 °C/min (Visessaguan *et al.*, 2001).

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una vía utilizando el paquete estadístico JMP versión 5.0.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). La comparación de medias fue realizada mediante rangos múltiples de Tukey-Kramer utilizando un nivel de significancia del 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil Electroforético

Se obtuvo un perfil electroforético tanto nativo (PAGE) como desnaturalizante (SDS-PAGE) de la miosina parcialmente purificada (Figura 4). En el caso del perfil nativo, se apreció que el proceso de extracción resultó ser favorable, ya que es posible observar bandas con PM de ~500 kDa, peso aproximado de la miosina. Esto se esperaba, pues se procuró trabajar en condiciones “óptimas” para la proteína, precisamente con la finalidad de alterar en lo mínimo a la proteína; no obstante, también se observa la presencia de una banda de ~355 kDa, la cual pudiera ser la cadena pesada de miosina. De igual forma, se observó una banda de ~98 kDa, la cual pudiera asociarse con paramiosina, reportada también en el análisis de la fracción miofibrilar de calamar gigante *D. gigas* por Rocha-Estrada *et al.* (2010), con un peso de ~97 kDa, así como por Mignino y Paredi (2006), con un peso de ~106 kDa, para vieira (*Z. patagónica*) y ~110 kDa para calamar (*I. argentinus*) y mejillón (*Aulacomya ater ater*).

Paramiosina es una proteína característica de los invertebrados, de ahí que sólo haya sido reportada para especies de moluscos y que constituye el centro de los filamentos gruesos rodeada por una capa cortical de miosina. Su contenido varía según la especie, llegando a alcanzar en algunas hasta un 50%. Es por esto que se considera responsable de la textura característica obtenida en los geles de invertebrados (Sano *et al.*, 1986; Ehara *et al.*, 2004), sugiriéndose de este modo que, ya sea el contenido de PM o las distintas relaciones que establece con miosina, estén relacionadas con el comportamiento térmico de las proteínas miofibrilares en los invertebrados marinos.

En lo que a la bandas obtenidas con SDS-PAGE se refiere, se observó una de peso ~200 kDa posiblemente correspondiente a la cadena pesada de la miosina (MHC), reportada también por Rocha-Estrada *et al.* (2010) para la misma especie (*D. gigas*) con un peso de ~220 kDa. Se observó que el peso molecular de la MHC no varió mucho entre distintas especies, ya que para bacalao (*Gadus morhua*) y lota (*Lota lota*), Riebroy *et al.* (2009), se reportaron pesos de ~212 kDa, mientras que Kristinsson y Hultin (2003) detectaron en bacalao una banda de ~205 kDa, encontrando además bandas de ~25 kDa, atribuidas a las cadenas ligeras, estas últimas no se observaron en el perfil obtenido en este trabajo. En lo que respecta a la banda de ~100 kDa,

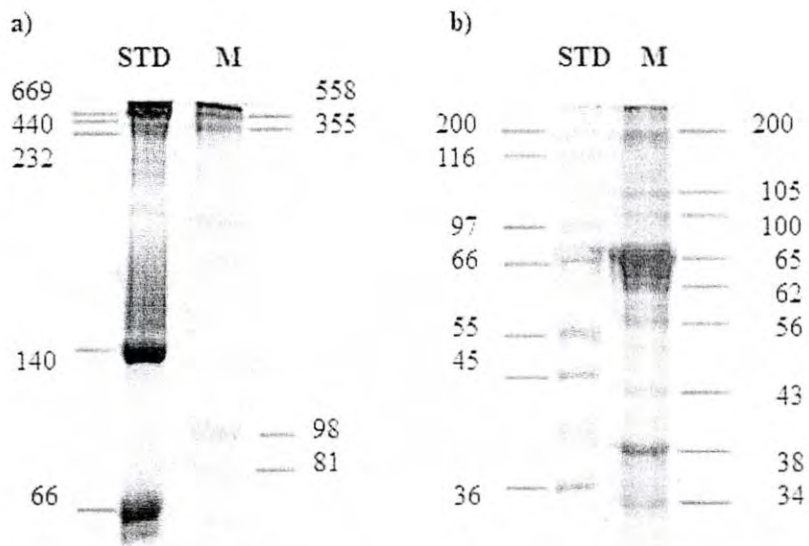


Figura 4. Perfil electroforético nativo (a) y SDS-PAGE (b) del extracto parcialmente purificado de miosina (M) y un estándar (STD). Los pesos moleculares se encuentran en kDa.

puede ser paramiosina, la cual ya fue reportada por Mignino y Paredi (2006) en vieira con un peso de 106 kDa.

En cuanto a la banda de peso ~65 kDa, puede relacionarse con fragmentos de la cola, lo cual fue reportado por Yuan *et al.* (2011), para carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*), considerándose como el fragmento S-2. Finalmente, se observó una banda correspondiente con el peso molecular de actina ~ 43 kDa. No obstante ésta no se encontró en el perfil nativo, lo cual podría suponer una posible hidrólisis de actina o de alguna otra proteína de mayor peso molecular; además una banda que pudiera ser tropomiosina (TM) ~ 38 kDa, reportada también por Shahidi y Venugopal (1994) en arenque (*Clupea harengus*), con un peso de ~ 35 kDa, así como por Mignino y Paredi (2006) quienes hicieron una comparación entre varias especies de moluscos, como la vieira (*Z. patagónica*), mejillón (*Aulacomya ater ater*) y calamar (*I. argentinus*), obteniendo fracciones con un peso molecular de ~35 kDa para TM.

Actividad ATPasa

En la Tabla 1 se muestra el efecto de la concentración de sal sobre la actividad ATPasa. Como puede apreciarse, la actividad enzimática fue mayor en la medida en que la concentración de sal se incrementó. Es decir, que al aumentar la fuerza iónica la actividad también aumentó (Tabla 1).

En el caso del estudio realizado por Riebroy *et al.* (2009) en actomiosina de bacalao (*Gadus morhua*) y lota (*Lota lota*), reportaron que al utilizar pH's ácidos se presentaba la formación de agregados, con la consecuente disminución de la actividad ATPasa, concluyendo de este modo, que dichos agregados seguramente se formaban en su mayoría en la región correspondiente a la zona de las cabezas.

Un comportamiento similar al antes mencionado se pudo presentar en el presente trabajo, esto se atribuye a que a mayor fuerza iónica se observó mayor actividad enzimática en la muestra, debido a que los iones presentes en la sal causan que la interacción entre cadenas cargadas opuestamente se debilite, induciendo un aumento en la solubilidad de la proteína (Rodger y Wilding, 1990), así como la mayor "disponibilidad" del sitio activo. Por lo que en la muestra de 0% las moléculas de miosina probablemente estén formando agregados, influyendo en la menor actividad detectada.

Tabla 1. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad ATPasa del extracto parcialmente purificado de miosina ¹.

Concentración de KCl (%)	Actividad ($\mu\text{mol Pi/min/mg}$)
0	30.91 \pm 0.01
1	66.44 \pm 0.00
3	84.35 \pm 0.02

¹Los valores son la media de 3 réplicas \pm sd.

Un comportamiento similar fue detectado en macarela (Mohan *et al.*, 2007) observándose una relación directa entre solubilidad y actividad ATPasa.

La actividad ATPasa detectada en el presente estudio fue mayor a la reportada para otras especies, como es el caso del bacalao (*Gadus morhua*), con $\sim 0.47 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Riebroy *et al.*, 2009), vieira (*Patinopecten yessoensis*) con $0.86 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Araki y Hasegawa, 2000) y tilapia (*Oreochromis mossambicus*) con $4.1 \mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ proteína/min (Murthy *et al.*, 2011), pudiendo esta diferencia estar relacionada con su comportamiento natatorio. Cuando el calamar presenta un nado lento, su gasto energético es similar al de cualquier pez, no obstante, cuando se siente atacado utiliza un sistema de propulsión a chorro en el que participan principalmente las fibras musculares centrales, las cuales son sometidas a altas presiones al llenarse de agua la cavidad del manto y ser liberada a presión. Todo esto implica un elevado costo energético, que debe ser cubierto de manera inmediata, sin mencionar que puede darse la situación de que dicho nado se realice de manera sostenida (De la Fuente-Betancourt, 2005).

Hidrofobicidad de Superficie

Como se puede apreciar en la Figura 5, en los tratamientos de concentración de sal de 0 y 1 % no se observan diferencias significativas ($p < 0.05$), no obstante en la concentración de 3 % se presentan valores sumamente mayores. Este comportamiento fue reportado también por Lin y Park (1998) para la miosina de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), quienes encontraron que la hidrofobicidad aumentaba de forma proporcional con el aumento de la concentración de sal presente en la muestra.

La explicación para este fenómeno se establece de la siguiente manera, primero hay que tener en consideración que si bien la mitad de los aminoácidos que componen la molécula de miosina son hidrofílicos, éstos radican en la parte exterior de la estructura de la molécula, dejando a la proteína con un centro hidrófobo (Tsuchiya and Matsumoto, 1975). Además, que al pH post-rigor (pH 6-7) en el músculo, los grupos carboxilo (COO^-) del ácido aspártico y glutámico se encuentran cargados negativamente, en tanto que los grupos amino (NH_3^+) de

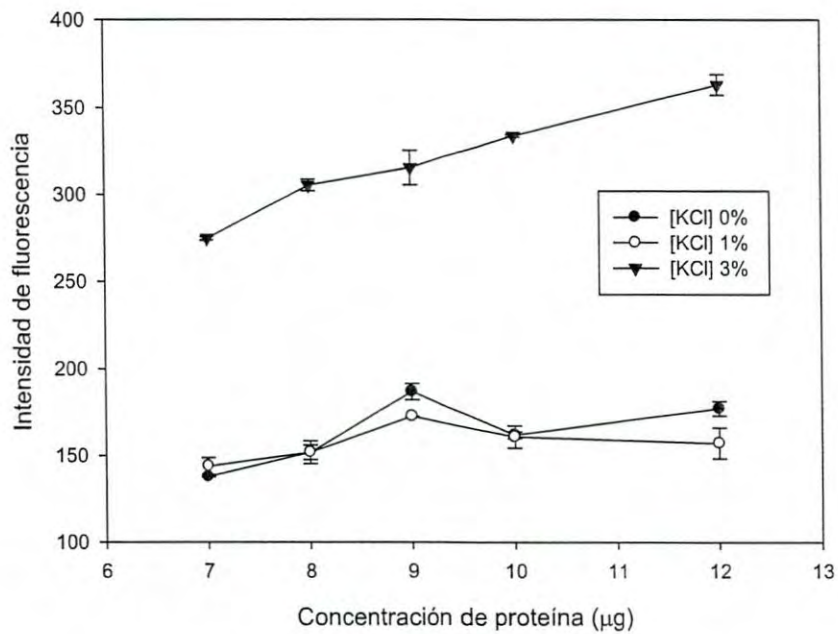


Figura 5. Efecto de la concentración de sal sobre la hidrofobicidad de superficie del extracto parcialmente purificado de miosina. Los valores son la media de $n=3$.

lisina, arginina e histidina tienen carga positiva. Por lo tanto, los monómeros de miosina se encuentran agregados debido a la formación de múltiples enlaces iónicos intra- e intermoleculares (Niwa, 1992). Dichos agregados presentan fuertes interacciones proteína-proteína, con una pequeña proporción área/volumen, razón por la que son insolubles.

Por lo anterior, al adicionar sal, los iones cargados positiva (K^+) y negativamente (Cl^-) se unen a los aminoácidos de carga contraria, rompiendo puentes salinos, permitiendo a los monómeros ser liberados y desdoblados parcialmente, provocando que la proteína exponga sus grupos hidrofóbicos. Aunado a esto, las estructuras secundaria y terciaria son estabilizadas por múltiples enlaces intramoleculares, incluyendo los iónicos. Es así que, la ruptura de éstos causa el despliegue parcial de la proteína, con la consecuente exposición de los grupos hidrofóbicos localizados en el centro de la estructura (Nakai y Li-Chan, 1988).

Los resultados obtenidos pueden relacionarse con los valores obtenidos para actividad, la cual, al igual que la hidrofobicidad, mostró un aumento a mayor contenido de sal (KCl). Se ha reportado que a mayor solubilidad también hay una mayor hidrofobicidad en la muestra (Kelleher y Hultin, 2000), siendo ésta debido al despliegue de la estructura, lo cual pudiera generar estructuras proteicas más libres, y con mayor facilidad para realizar la respectiva catálisis, repercutiendo en una mayor actividad ATPasa (Harrington y Rodgers, 1984).

Grupos Sulfhidrilos

En el caso de los grupos sulfhidrilo totales (SH-T) no se observó variación, comportamiento que se esperaba ya que el número de los mismos presentes en la molécula no se ve afectado por condiciones externas como la concentración de sal (Tabla 2), obteniéndose valores de ~ 0.9 mol/ 10^5 g de proteína, no obstante resultan menores a los reportados para otras especies, como son bacalao (*Gadus morhua*) y lota (*Lota lota*) (Riebroy *et al.*, 2009), donde se reportaron valores de ~ 4.8 mol/ 10^5 g de proteína, así como los obtenidos para lenguado (*Atheresthes stomias*) (Visessaguan *et al.*, 2001), de ~ 6 mol/ 10^5 g de proteína. Esta menor cantidad de SH-T se relaciona directamente con una menor cantidad de grupos SH-R, y en consecuencia, con la debilidad en geles elaborados a partir de concentrados proteicos de calamar. Por otra parte un contenido menor de grupos SH podría ser la causa del porqué la miosina del calamar gigante presente temperaturas de desnaturalización menores a las de otras fuentes. De igual

Tabla 2. Efecto de la concentración de KCl sobre los grupos sulfhidrilos ¹.

Muestra (%)	Grupos SH (mol/10 ⁵ gprot)	
	Reactivos	Totales
0	0.55±0.01 ^c	0.89±0.01 ^a
1	0.61±0.02 ^b	0.93±0.00 ^a
3	0.92±0.00 ^a	0.97±0.02 ^a

¹Los valores son la media ± la desviación estándar de n=3. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

forma, un contenido menor de grupos SH, también pudiera explicar sus diferencias catalíticas en relación con otras fuentes.

En el caso de miosina de salmón (Lin y Park, 1998), al igual que en el presente estudio, la adición de sal no parece haber afectado de ninguna manera el contenido de SH-T, no obstante Lin y Park (1998) obtuvieron valores mayores a los detectados en este trabajo ($\sim 6.5 \text{ mol}/10^5 \text{ g}$ de proteína). Sin embargo, estos autores concluyen que el contenido constante de los grupos SH-T independientemente de la concentración de KCl utilizado, sugiere que la sal, a cualquier nivel, no causa la ruptura o formación de puentes disulfuro, de ahí que no se observaran variaciones significativas.

En lo que se refiere a los sulfhidrilos reactivos (SH-R), hay que tener en cuenta que en la proteína nativa se encuentran localizados en la superficie y algunos se encuentran en el centro de la estructura, ya que una porción de los mismos se oxida y forma puentes disulfuro para su estabilización. Los resultados en cuanto a éstos compuestos, muestran un aumento al incrementar la concentración de sal (KCl) en la muestra, coincidiendo una vez más con lo reportado por Lin y Park (1998) para la miosina de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*), quienes establecen que cuando los enlaces iónicos de la estructura proteica son rotos por efecto de la sal provocan el desdoble parcial de la proteína, por lo tanto, los grupos SH que se encuentran sepultados al centro de la estructura quedan expuestos, pudiendo ser detectados entonces por el DTNB [(5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)], el cual únicamente se une a los grupos localizados en la superficie o en cavidades accesibles (Visschers y Harmen de Jongha, 2005).

Aunque el comportamiento de la miosina en cuanto a la presencia de sales es similar al de otras especies marinas, el contenido de SH-R fue más bajo, obteniéndose $\sim 1 \text{ mol}/10^5 \text{ g}$ de proteína, mientras que para salmón y carpa se han reportado valores de $\sim 6.5 \text{ mol}/10^5 \text{ g}$ de proteína y $\sim 6 \text{ mol}/10^5 \text{ g}$ proteína, respectivamente (Lin y Park, 1998; Tsuchiya y Matsumoto, 1975). Lo cual sugiere que exista alguna relación entre esta diferencia de SH-R y los valores de fuerza, en los geles obtenidos a partir de calamar gigante, en comparación con los elaborados con otras especies. El número de grupos SH libres determinan la formación de enlaces disulfuro, ya que son considerados una de las fuerzas más importantes en lo que respecta al mejoramiento de las propiedades texturales en productos procesados por calor, como es el caso de la elaboración de geles (Niwa, 1992).

Los valores obtenidos presentan cierta relación con los resultados observados para hidrofobicidad, si bien los grupos SH se encuentran en su mayoría en la superficie de la molécula y sólo unos cuantos en el centro, estos últimos quedan expuestos, una vez que la estructura es desplegada por efecto de la sal, de ahí que a mayor concentración de la misma también se presentara un aumento en los grupos SH-R. Lo mismo ocurre en el índice de hidrofobicidad, observándose en ambos casos un aumento considerable en el caso de la muestra con concentración de sal de 3 %.

Calorimetría de Barrido Diferencial

Los tres tratamientos presentaron únicamente una transición a los 46 °C (Tabla 3), probablemente correspondiente a miosina, componente mayoritario del extracto proteico. A pesar de que se obtuvo un ligero desplazamiento en la temperatura de desnaturalización, éste no fue significativo ($p \geq 0.05$), lo cual explica que, la formación de puentes salinos intra o intermoleculares, no son suficientes para causar un aumento en la temperatura de desnaturalización.

En cuanto a la temperatura del pico, es similar a la reportada para miosina de lenguado (*Atheresthes stomias*) (Visessaguan *et al.*, 2001), la cual tuvo una T_{max} en el rango de 25-46° C, misma que se presenta para la mayoría de los peces (Ogawa *et al.*, 1993), y está relacionada con aquellos de aguas frías como el bacalao y el arenque (Davies *et al.*, 1994). No obstante, resulta inferior a las temperaturas de especies como la vieira, la cual puede llegar hasta los 78 °C (Paredi *et al.*, 2003), siendo inferior también a las temperaturas reportadas en mamíferos, como pollo, pavo, res y cerdo, cuya transición ocurre normalmente a 45-55° C. Estos resultados sugieren lo ya establecido por numerosos estudios, que la miosina de especies marinas, incluida la del calamar, son altamente inestables al calor y su susceptibilidad puede estar relacionado a la temperatura del hábitat del animal (Johnston *et al.*, 1973). Lo anterior pudiera ser atribuido a una menor interacción electrostática entre las miosinas de organismos acuáticos, lo cual repercute en una mayor inestabilidad a bajas temperaturas (Johnston *et al.*, 1973; Hashimoto *et al.*, 1982).

La miosina de organismos marinos generalmente presenta temperaturas de desnaturalización inferiores a las de los mamíferos, sin embargo, la miosina del calamar es aún menor que la

Tabla 3. Efecto de la concentración de KCl sobre la temperatura de transición (Tmax) y cambio de entalpía (ΔH) en el extracto parcialmente purificado de miosina ¹.

Muestra (%)	Temperatura (T _p , °C)	ΔH (J/g)
0	46.01±0.00 ^a	0.13±0.04
1	46.02±0.01 ^a	0.16±0.06
3	46.05±0.04 ^a	0.07±0.00

¹Los valores son la media \pm la desviación estándar de n=3. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0.05).

reportada para la mayoría de las especies marinas. Esta diferencia puede estar estrechamente relacionada con el menor contenido de grupos SH presentes en la miosina de calamar, en comparación con otras especies. Al presentar una menor cantidad de grupos SH-R la molécula cuenta con una menor estabilización por efecto de los puentes disulfuro, presentando de este modo mayor inestabilidad frente al aumento de temperatura.

Es importante tener en cuenta que los resultados pueden llegar a variar de manera considerable al utilizarse especies distintas, así como al variar condiciones experimentales, como pueden ser pH y la velocidad de calentamiento (Park y Lanier, 1990), lo cual hace difícil determinar la temperatura de transición de regiones específicas de miosina, mediante comparación de los termogramas obtenidos con el de otras especies. Aun así, se ha postulado que la región tipo “bisagra” que se encuentra cercana al centro de la cola de miosina puede ser el primer dominio en desplegarse, debido a su menor estabilidad térmica y susceptibilidad a la proteólisis (Wang y Smith, 1994). Esto pudiera llevar a esperar la presencia de varios picos, no obstante Lo *et al.* (1991), estudiando la miosina de marlin negro (*Makaira mazara*) observaron que el fragmento S-1 y una porción de la cola presentaban una temperatura de transición de 41 °C, por lo que sólo se estaría observando un pico ligeramente ancho en dado caso que los fragmentos presentaran temperaturas semejantes entre sí.

Viscosidad

La medición de este parámetro resulta importante, ya que, propiedades fisicoquímicas inherentes, como el peso molecular, hidrofobicidad y la conformación de cada especie proteica afectan la viscosidad de la solución. De igual manera, la concentración y propiedades fisicoquímicas del resto de los solutos iónicos y no iónicos ejercen una influencia importante, contribuyendo directamente a la viscosidad por su tendencia a interaccionar con las proteínas presentes en la solución (Schenz y Morr, 1996).

Es por esto que factores como la fuerza iónica ejercen un efecto notable en la viscosidad de la solución, lo cual puede apreciarse en la Figura 6. El comportamiento fue semejante en los tres tratamientos, una disminución en la viscosidad hasta llegar alrededor de los 40 °C, excepto en la concentración de sal de 0 % donde es más abrupta y llega a los 45 °C. Esta misma reducción

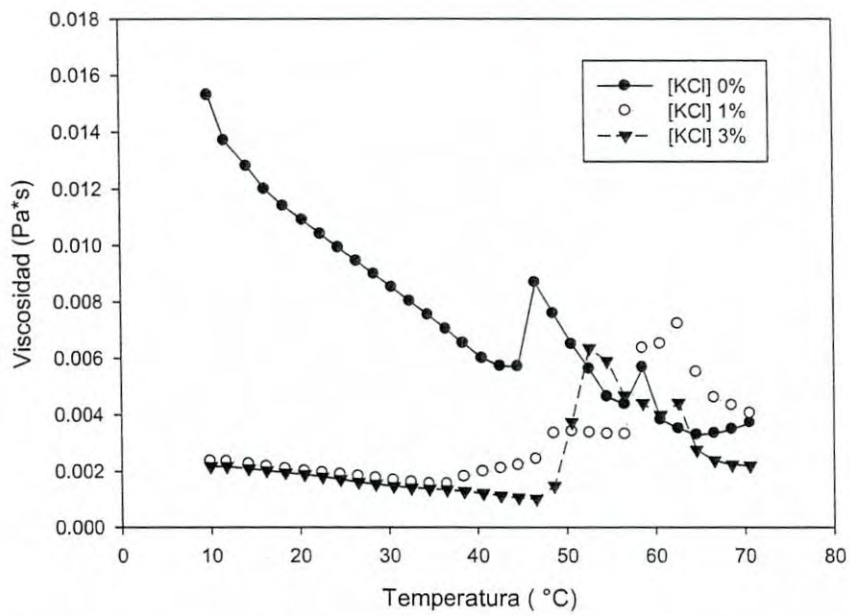


Figura 6. Efecto de la concentración de sal sobre en la viscosidad del extracto parcialmente purificado de miosina. Los valores son la media de n=3.

fue observada también en carpa (*Hipophthalmichthys molitrix*) por Pan *et al.* (2011), atribuyéndose a los cambios conformacionales que sufre la proteína durante su calentamiento, debido a que durante este periodo, los puentes de hidrógeno son rotos, llevando al desplegamiento de la estructura proteica.

El aumento detectado a partir de los ~40-45 °C, es similar a lo reportado en corvina (*Micropogonias undulatus*) y conejo (Liu *et al.*, 1982; Samejima *et al.*, 1981), sólo que en estos organismos se observó a temperaturas menores (~30-35 °C). Este incremento puede ser debido a la interacción intermolecular de la proteína, especialmente entre los grupos hidrofóbicos. Este aumento también está relacionado con el desplegamiento “aleatorio” causado por efecto de la temperatura, ya que se ha documentado que la viscosidad intrínseca en soluciones de este tipo presenta un aumento, debido al mayor volumen efectivo en la solución (Van Holde, 1985).

En general, se aprecia que la concentración de sal presente en la muestra no ejerce un efecto observable en lo que a la temperatura de desnaturalización se refiere, ya que se presenta alrededor de los 45 °C en los tres tratamientos, coincidiendo con la temperatura de desnaturalización obtenida en calorimetría. No obstante, se observa un desplazamiento de los picos obtenidos en la gráfica hacia la derecha conforme la concentración de sal en la muestra aumenta, dicho desplazamiento concuerda con los resultados obtenidos tanto en sulfhidrilos como en actividad y en menor medida con hidrofobicidad, ya que en dichas pruebas también se observó un comportamiento semejante al presentar mayores valores los tratamientos de 1 y 3%. Pudiendo lo anterior ser debido a una diferencia en los cambios conformacionales que se dan entre un tratamiento y otro, influyendo con las diferencias que se presentan en el proceso de gelificación.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio se establece que la miosina aislada del manto de calamar gigante posee una menor cantidad de grupos sulfhidrilos totales y reactivos, al ser comparada con lo reportado en la literatura para otras especies marinas.

Asimismo, esta proteína fue sensible a la concentración de sal en el medio de reacción, presentando mayor solubilidad, mayor actividad enzimática, así como una mayor hidrofobicidad de superficie a mayor concentración de KCl, indicando que la proteína tiende a desplegarse por la acción de los iones presentes en la sal sobre los aminoácidos cargados presentes en las moléculas.

La viscosidad de la solución de miosina, presentó un comportamiento similar al de miosina de otros organismos marinos, disminuyendo al aumentar la concentración de sal.

Los resultados del presente experimento sugieren que la debilidad reportada en geles, obtenidos a partir de concentrados proteicos de calamar, posiblemente se relacione con una menor concentración de grupos sulfhidrilos en la molécula de miosina, sugiriendo diferencias estructurales en esta molécula, comparada con la detectada en otras especies marinas.

RECOMENDACIONES

Aislar miosina de calamar recién capturado, ya que, el tiempo de captura de calamar influye en las propiedades que presenten las moléculas.

Purificar miosina con el fin de tener información más detallada de la molécula presente en el manto del calamar gigante, ya que la presencia de otros compuestos pueden afectar o alterar los resultados obtenidos.

Establecer las características conformacionales y estructurales de la miosina del manto de calamar mediante diferencias técnicas espectrofotométricas y microscópicas.

REFERENCIAS

- Abugoch, L., Guarda, A., Pérez, L.M. & Paredes, M.P. (1999). Determination of proximal chemical of squid (*Dosidicus gigas*) and development of gel products. *Archive of Latinamerican Nutrition*, 49(2), 156-161.
- Anónimo. (2008). "*Dosidicus gigas*, Jumbo Squid" (On-line). Marine Bio. Recuperado de: <http://marinebio.org/species.asp?id=249>.
- Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. (2011). Recuperado de: www.conapesca.sagarpa.gob.mx.
- Araki, T. & Hasegawa, Y. (2000). Isolation and characteristics of intrinsic myosin in mantle pallial cell layer of scallop. *Fisheries Science*, 66, 743-747.
- Asghar, A., Samejima, K. & Yasui, T. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat-products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22(1), 27-106.
- Bagshaw, C.R., Eccleston, J.F., Eckstein, F., Goody, R.S., Gutfreund, H., & Trentham, D.R. (1974). The magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase of myosin. Two-step processes of adenosine triphosphate association and adenosine diphosphate dissociation. *Biochemistry Journal*, 141, 351-364.
- Berg, J.S., Powell, B.C., & Cheney, R.E. (2001). A millennial myosin census. *Molecular Biology of the Cell*, 12, 780-794.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 142-146.
- Chan, J.K., Gill, T.A. & Paulson, A.T. (1992). Cross-linking ability of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting. *Journal of Food Science*, 57, 906-12.
- Chan, J.K., Gill, T.A. & Paulson, A.T. (1993). Thermal aggregation of myosin subfragments from cod and herring. *Journal of Food Science*, 58, 1057-1069.
- Cortés-Ruiz, J.A. (2007). Obtención de un concentrado proteico funcional a partir de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y estudio fisicoquímico y estructural de las

proteínas recuperadas. Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. Hermosillo, México.

- Craig, R. & Woodhead, L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 204-212.
- Davies, J.R., Ledward, D.A., Bardsley, R.G. & Poulter, R.G. (1994). Species dependence of fishmyosin stability to heat and frozen storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 287-301.
- De La Cruz, E.M., & Ostap, E.M. (2004). Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Current Opinion in Cellular Biology*, 16, 61-67.
- De la Fuente-Betancourt, G. (2005). Notas de un calamar. Recuperado de: www.ciad.mx/boletin/JulAgo05/NotasCalamarCAID.pdf
- Dill, K.A. & Shortle, D. (1991). Denature states of proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 60, 795-825.
- Dublan-Garcia, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. & Ponce-Alquicira, E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods*, 17(3), 291-310.
- Ehara, T., Nakagawa, K., Tamiya, T., Noguchi, S. F. & Tsuchiya, T. (2004). Effect of paramyosin on invertebrate natural actomyosin gel formation. *Fisheries Science*, 70, 306-313.
- Ehrhardt, N., Jacquemin F., García B., González D., López B., Ortiz C. & Solís, N. (1983). On the fishery and biology of the giant squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, México. In *Advances in Assessment of World Cephalopod Resources* (J.F. Caddy, ed), FAO Fisheries technical papers.
- Fink, A.L., Calciano, L.J., Goto, Y., Kurotsu, T. & Palleros, D. (1994). Classification of acid denaturation of proteins: Intermediates and unfold states. *Biochemistry*, 33, 12504-12511.
- Focant, B. & Huriaux, F. (1976). Light chains of carp and pike skeletal muscle myosin. Isolation and characterization of the most anodic light chain on alkaline pH electrophoresis. *FEBS Letters*, 65, 16-19.

- Foth, B.J., Goedecke, M.C., & Soldati, D. (2006). New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 3681–3686.
- Geeves, M.A., & Holmes, K.C. (1999). Structural mechanism of muscle contraction. *Annual Review of Biochemistry*, *68*, 687–728.
- Geeves, M.A., & Holmes, K.C. (2005). The molecular mechanism of muscle contraction. *Advances in Protein Chemistry*, *71*, 161–193.
- Gershman, L.C., Dreizen, P. & Stracher, A. (1966). Subunit structure of myosin II. Heavy and light alkali components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *56*, 966-973.
- Gershman, L.C., Stracher, A. & Dreizen, P. (1969). Subunit structure of myosin. *Journal of Biological Chemistry*, *244*, 2726-2736.
- Gill, T.A., Chan, J.K., Phonchaeron, K.F. & Paulson, A.T. (1992). Effect of salt concentration and temperature on heat-induced aggregation and gelation of fish myosin. *Food Research International*, *25*, 333-341.
- Gómez-Guillén, M.C., Martínez-Alvarez, O. & Montero, P. (2003). Functional and thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. *Journal of food science*, *68*(6), 1962-1967.
- Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., Solas, M.T. & Borderías, A.J. (1998). Thermally induced aggregation of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle proteins. Physicochemical contribution of added ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(9), 3440–6.
- Goto, Y. & Fink, A.L. (1989). Conformational states of β -lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry*, *28*, 945-952.
- Goto, Y., Calciano, L.J. & Fink, A.L. (1990). Acid-induced folding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*, 573-577.
- Harrington, W.F. & Burke, M. (1972). Geometry of the myosin dimer in high-salt media. I. Association behavior of rod segments from myosin. *Biochemistry*, *11*, 1448-1455.
- Harrington, W.F. & Rodgers, M.E. (1984). Myosin. *Annual Review of Biochemistry*, *53*, 35-73.

- Hashimoto, A., Kobayashi, A. & Arai, K. (1982). Thermostability of fish myofibrillar Ca-ATPase and adaptation to environmental temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48, 671-684.
- Hernández-Herrera, A., Morales-Bojórquez, E., Cisneros-Mata, M.A., Nevárez-Martínez, M.O. & Rivera-Parra, G.I. (1998). Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) from Gulf of California, México. *California Cooperative Oceanic Fisheries Reports*, 39, 212-218.
- Hultin H.O. y Kelleher S.D. (1999). Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. Rockport, MA: Advanced Protein Technologies, Inc. US. Patent 6005073. <http://www.freepatentsonline.com/6005073>.
- Hultin H.O. y Kelleher S.D. (2000). High efficiency alkaline proteins extraction. U.S. patent 6136959. Univ. Of Massachusetts.
- Hurtado, J.L., Borderías, J., Montero, P. & An, H. (1999). Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. *Journal of Food Biochemistry*, 23(4), 469–83.
- Johnston, I.A., Freason, N. & Golberg, G. (1973). The effect of environmental temperature on the properties of myofibrillar adenosine triphosphatase from various species of fish. *Biochemical Journal*, 133, 735–738.
- Johnson, K.A. & Taylor, E.W. (1978). Intermediate states of subfragment 1 and actosubfragment 1 ATPase: *Reevaluation of the mechanism*. *Biochemistry*, 17, 3432–3442.
- Kato, S. & Konno, K. (1993). Isolation of carp myosin rod and its structural stability. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 539–544.
- Kato, S., Koseki, H. & Konno, K. (1996). Oligomerization of carp myosin which retains its ATPase activity. *Fisheries Science*, 62, 985–989.
- Katoh, N., Uchiyama, H., Tsukamoto, S. & Arai, K. (1977). A biochemical study of fish myofibrillar ATPase. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43, 857-867.
- Kelleher S.D., Feng Y., Kristinsson H.G., Hultin H. O. & McClements D.J. (2004). Functional fish protein isolates prepared using low ionic strength, acid solubilization/precipitation. *Developments in Food Science*, 42, 407-414.

- Kelleher, S.D. y Hultin, H.O. (2000). Functional chicken muscle protein isolates prepared using low ionic strength, acid solubilisation/precipitation. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 53, 76–81.
- Kielley, W.W. & Bradley, L.B. (1956). The relationship between sulfhydryl groups and the activation of myosin adenosinetriphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, 218, 653–659.
- Kier, W.M. & Curtin, N.A. (2002). Fast muscle in squid (*Loligo pealei*): Contractile properties of a specialized muscle fibre type. *Journal of Experimental Biology*, 205, 1907–1916.
- Kier, W.M. & Thompson, J.T. (2003). Muscle arrangement, function and specialization in recent coleoids. *Berliner Paläobiologische Abhandlungen*, 3, 141–162.
- Kimura, I., Murozuka, T. & Arai, K. (1977). Comparative studies on biochemical properties of myosins from frozen muscles of marine fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43, 315–321.
- King, L. & Lehrer, S.S. (1989). Thermal unfolding of myosin rod and light meromyosin: Circular dichroism and tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry*, 28, 3498–3502.
- Klett, A. (1996). Pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). En Casas-Valdez M, Ponce-Díaz G (Eds.) Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. I. SEMARNAP, FAO, INP, CIBNOR, CICMAR, CETMAR. México. pp. 127–149.
- Kolodziejaska, I., Sikorski, Z.E. & Sadowska, M. (1987). Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influenced by specimen characteristics and treatments. *Journal of food science*, 52(4), 932–5.
- Konno, K., Yamamoto, T., Takahashi, M. & Kato, S. (2000). Early structural changes in myosin rod upon heating of carp myofibrils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4905–4909.
- Konno, K., Young-Je, C., Yoshioka, T., Shinho, P. & Seki, N. (2003). Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Fisheries Science*, 69, 204–209.
- Kreuzer, R. (1986). Squid Seafood Extraordinaire. *Infofish marketing digest*, 6 (86), 29–32.

- Kristinsson, H. & Hultin, H.O. (2003). Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7187-7196.
- Lee, H. & Lanier, T. (1995). The role of covalent crosslinking in the texturizing of muscle protein sols. *Journal of Muscle Foods*, 6(1), 125-138.
- Lin, T.M. & Park, J.W. (1998). Solubility of salmon myosin as affected by conformational changes at various ionic strengths and pH. *Journal of Food Science*, 63, 215-218
- Liu, Y.M., Lin, T.S. & Lanier, T.C. (1982). Thermal denaturation and aggregation of actomyosin from Atlantic croaker. *Journal of Food Science*, 47, 1916-1920.
- Lo, J.R., Iso, N., Taguchi, T., Tanaka, M., Mochizuki, Y. & Nagashima, Y. (1991). Thermal transitions of myosins/subfragments from black marlin, (*Makaira mazara*) ordinary and dark muscles. *Journal of Food Science*, 56(1), 954-7.
- Lovgren, S. (2003). Researchers Shed Light on Mysterious Jumbo Squid. *National Geographic News*. Recuperado de: http://news.nationalgeographic.com/news/2003/07/0718_030718_jumbosquid.html.
- Lowey, S. (1965). Comparative study of the alpha-helical muscle proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 2421-2427.
- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G. & Baker, H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation. *Journal of Molecular Biology*, 42(1), 1-29.
- Lymn, R.W. & Taylor, E.W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry*, 10, 4617-4624.
- Macgillivray, P.S., Anderson, E.J., Wright, G.M. & Demont, M.E. (1999). Structure and mechanics of the squid mantle. *Journal of Experimental Biology*, 202, 683-695.
- McLachlan, A.D. & Karn, J. (1982). Periodic charge distribution in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature*, 299, 226-234.
- Markaida, U., Rosenthal, J.C. & Gilly, W.F. (2003). Tagging Studies on the Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Mexico. *Fishery Bulletin*, 103, 219-226.

- Markaida, U. & Sosa-Nishiaki, O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fisheries Research*, 54(1), 63-82.
- Martínez-Aguilar, S., Morales-Bojórquez, E., Díaz-Uribe, J.G., Suárez-Higuera, M. & Hernández-Herrera, A. (2010). La pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el golfo de California. Recomendaciones de investigación y tácticas de regulación. Recuperado de: www.conapesca.sagarpa.gob.mx.
- Mignino, L.A. & Paredi, M.E. (2006). Physico-chemical and functional properties of myofibrillar proteins from different species of molluscs. *Food Science and Technology*, 39, 35-42.
- Mohan, M., Ramachandran, D., Sankar, T.V. & Anandan, R. (2007). Physicochemical characterization of muscle proteins from different regions of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*). *Food Chemistry*, 106, 451-457.
- Monhatan, F.J., German, J.B. & Kinsella, J.E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 46-52.
- Morales-Bojórquez, E., Hernández-Herrera, A., Nevárez-Martínez, M.O., Díaz de León, A.J., Rivera-Parra, G.I. & Ramos, A. (1997). Abundancia poblacional del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en las costas de Sonora, México. *Océánides*, 12(2), 91-96.
- Morales-Bojórquez, E., M.A. Cisneros-Mata, A. Hernández-Herrera, M.O. & Nevárez-Martínez. (2001). Review of stock assessment and fisheries research for *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research*, 54, 393-404.
- Moreno-Martínez, A.G., Ramírez-Olivas, R., Ezquerro-Brauer, J. M., Ocaño-Higuera, V.M. & Cárdenas-López, J.L. (2012). Una revisión de las enzimas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con énfasis en las hidrolasas. *Biotecnia*, 14(2), 18-25.
- Murozuka, T. & Arai, K. (1976). Purification and thermo-stability of myosin Ca-ATPase from the frozen muscle of yellow fin tuna. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42, 65-70.
- Murozuka, T., Takashi, R. & Arai, K. (1976). Relative thermo-stabilities of Ca-ATPase of myosin and actomyosin from tilapia and rabbit. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42, 57-63.
- Murthy, L.N., Panda, S.K. & Shamasundar, B.A. (2011). Physico-chemical and functional properties of proteins of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Food Process Engineering*, 34, 83-107.

- Nakai, S. & Li-Chan, E. (1988). Hydrophobic Interactions in Food Systems. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Nevárez, M. M., Rivera, P.G.I., Morales-Bojorquez, López, M. J., Lluch, C.D.B., Miranda, M.E. & Cervantes, V.C. (2002). The Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) Fishery of the Gulf of California and its Relation to Environmental Variability. *Investigaciones Marinas*, 30(1), 193-194.
- Nigmatullin, C., Nesis, K. & Arkhipkin, A. (2001). A Review of the Biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 54, 9-19.
- Niwa, E. 1992. Chemistry of surimi gelation. In *Surimi Technology*; Lanier, T.C., Lee, C.M. Eds.; Dekker: New York. pp-389.
- Niwa, E., Kanoh, S., Osaka, Y., Nakayama, T., Watabe, S. & Hashimoto, K. (1989). Changes in surface hydrophobicity of fish actomyosins induced by urea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1), 143-146.
- Niwa, E., Sato, K., Suzuki, R., Nakayama, T. & Hamada. I. (1981). Fluorometric study of setting properties of fish flesh sol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 817-21.
- Ogawa, M., Ehara, T., Tamiya, T. & Tsuchiya, T. (1993). Thermal stability of fish myosin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106(3), 517-521.
- Olsen, R. & J. Young. (2007). The role of squid in open ocean ecosystems. Report of a GLOBEC-CLIOTOP/PFRP workshop, 16-17 November 2006, Honolulu, Hawaii, USA.. *GLOBEC Report*. 24, 1-94.
- Ozog, A. & Bechet, J.J. (1995). The effect of pH on the folding and stability of the myosin rod. *European Journal of Biochemistry*, 234, 501-505.
- Palafox, H., Córdova-Murueta, J. H., Navarrete del Toro, M. A. & García-Carreño, F. L. (2009). Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. *Process Biochemistry*, 44, 584-587.
- Pan, J., Shen, H., You, J. & Luo, Y. (2011). Changes in physicochemical properties of myofibrillar protein from silver carp (*hypophthalmichthys molitrix*) during heat treatment. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 939-952.

- Paredi, M. E., Tomas, M. C., & Crupkin, M. (2003). Thermal behavior of myofibrillar proteins from the adductor muscles of scallops. A differential scanning calorimetric study (DSC). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, 153–159.
- Park, J. W., Lanier, T. C. (1990). Effects of salt and sucrose addition on thermal denaturation and aggregation of water-leached fish muscle. *Journal of Food Biochemistry*, 14, 395.
- Ramírez de León, J. A, Uresti, R.M., Aldana, M.L. y Loarca, M.G.F. (2013). Avances de ciencia y tecnología alimentaria en México. Ed. Plaza y Valdez. México.
- Ramírez-Suarez, J.C., Ibarra-León, L.R., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E., García-Sánchez, G. & Carvallo-Ruiz, G. (2008). Physicochemical and functional changes in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle during ice storage. *Food Chemistry*, 111, 586-591.
- Raghavan, S. & Kristinsson, H.G. (2007). Conformational and rheological changes in catfish myosin as affected by different acids during acid-induced unfolding and refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4144-4153.
- Riebroy, S., Benjakul, S. & Vissesanguan, W. (2009). Acid-induced gelation of natural actomyosin from atlantic cod (*Gadus morhua*) and burbot (*Lota lota*). *Food Hydrocolloids*, 23, 26-39.
- Rocha-Estrada, J.G, Córdova-Murueta, J.H. & García-Carreño, F.L. (2010). Functional properties of protein from frozen mantle and fin of jumbo squid *Dosidicus gigas* in function of pH and ionic strength. *Food Science and Technology International*, 16(5), 451-8.
- Rodger, G.W. y Wilding, P. (1990). Muscle proteins. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 361-400). New York: Elsevier Applied Science.
- Rosenfeld, S.S. & Taylor, E.W. (1987). The mechanism of regulation of actomyosin subfragment 1 ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 9984–9993.
- Samejima, K., Ishioroshi, M. & Yasui, T. (1981). Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *Journal of Food Science*, 46, 1410-1411.
- Sano, T., Noguchi, S. F., Tsuchiya, T. & Matsumoto, J. J. (1986). Contribution of paramyosin to marine meat gel characteristics. *Journal of Food Science*, 51, 946–950.
- Shahidi, F. & Venugopal, V. (1994). Solubilization and thermostability of water dispersions of

muscle structural proteins of atlantic herring (*Clupea harengus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1440-1446.

Schenz, T.W. & Morr, C.R. (1996). Viscosity. In M. G. Hall (Ed.), *Methods of testing protein functionality*(pp. 62–73). London, UK: Blackie Academic & Professional Chapman and Hall.

Sellers, J. R. (1999). *Myosins*, 2 ed.; Oxford University Press: Oxford, UK.

Sikorski, Z.E. & Kolodziejska, I. (1986). The Composition and Properties of Squid Meat. *Food Chemistry*, 20, 213-224.

Staaf, D., Camarillo-Coop S., Haddock S., Nyack A., Payne J., Salinas-Zavala C., Seibel B., Trueblood L., Widmer C. & Gilly W. (2008). Natural Egg Mass Deposition by the Humboldt Squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California and Characteristics of Hatchlings and Paralarvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88, 759-770.

Stanley, D.W. & Hultin, H.O. (1984). Proteolytic activity in North American squid and its relation to quality. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 17(3), 163–7.

Stefansson, G. & Hultin, H.O. (1994). On the solubility of cod muscle proteins in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2656 -2664.

Szuchet, S. & Zobel, C.R. (1974). The dissociation of myosin in acid. *Biochemistry*, 13, 1482-1491.

Taguchi, T., Ishizaka, M., Tanaka, M., Nagashima, Y. & Amano, K. (1987). Protein-protein interaction of fish myosin fragments. *Journal of Food Science*, 52(4), 1110-1103.

Takahashi, M., Yamamoto, T., Kato, S. & Konno, K. (2005). Species-specific thermal denaturation pattern of fish myosin when heated as myofibrils as studied by myosin subfragment-1 and rod denaturation rates. *Fisheries science*, 71, 405-413.

Tazawa, T., Kato, S., Katoh, T. & Konno, K. (2002). Role of neck region in the thermal aggregation of myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 196–202.

R T 140096

- Tsuchiya, T. & Matsumoto, J. (1975). Isolation, purification and structure of carp myosin, HMM and LMM. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42(12), 1319-26.
- Van Holde, K.E. (1985). *Physical Biochemistry*, pp. 164-181, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Visessaguan, O., Ogawa, M., Nakai, S. & An, H. (2001). Physicochemical changes and mechanism of heat-induced gelation of arrowtooth flounder myosin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(4), 1016-23.
- Visschers, R.W. & Harmen de Jongha, H.J. (2005). Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*, 23, 75-80.
- Wang, S. F. & Smith, D. M. (1994). Heat-induced denaturation and rheological properties of chicken breast myosin and F-actin in the presence and absence of pyrophosphate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 2665-2670.
- Wicker, L., Lanier, T. C., Hamann, D.D. & Akahane, T. (1986). Thermal transitions in myosin-ANS fluorescence and gel rigidity. *Journal of Food Science*, 51, 1540-43.
- Xiong, Y.L.L. (1994). Myofibrillar protein from different muscle-fiber types Implications of biochemical and functional-properties in meat processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 34(3), 293-320.
- Yasui, T., Ishioroshi, M. & Samejima, K. (1980). Heat-induced gelation of myosin in the presence of actin. *Journal of Food Biochemistry*, 4, 61.
- Yuan, C., Wang, X., Chen, S., Qu, Y. & Konno, K. (2011). Structural stability of myosin rod from silver carp as affected by season. *Journal of food science*, 76(5), C686-C692.
- Zeldberg, L., Louis, D. & Robison, B. (2007). Range Expansion by the Humboldt Squid, *Dosidicus gigas*, in the Eastern North Pacific. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104, 12948-12950.