

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

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

“EFECTO DE LOS PULSOS ULTRASÓNICOS SOBRE LA PROPIEDAD
ESPUMANTE DE PROTEÍNA MIOFIBRILAR DE CALAMAR GIGANTE
(*Dosidicus gigas*)”

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

1942

Presenta:

Q.A. Isabel Arredondo Parada

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Efecto de los Pulsos Ultrasónicos sobre la Capacidad Espumante de Proteína Miofibrilar de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

Q.A. Isabel Arredondo Parada

Dr. Enrique Márquez Ríos
Director de Tesis

Dra. Guadalupe Miroslava Suárez Jiménez
Secretario

Dr. Wilfrido Torres Arreola
Vocal

Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez
Vocal

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 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 Coordinador del Programa del Posgrado.

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

Atentamente

Q.A. Isabel Arredondo Parada

Dr. Francisco Rodríguez Félix

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco en gran medida a todos los que formaron parte del desarrollo del presente trabajo, ya sea directa o indirectamente, a lo largo de la maestría. Gracias, familia, amigos, compañeros y profesores, por el apoyo y paciencia recibido dentro y fuera de la institución.

Muchas gracias a **Coty**, que siempre ha estado al pendiente de todos y al pie del cañón en todo. Se le quiere y agradece mucho.

Muchas gracias al comité, **Dr. Enrique Márquez, Dra. Miroslava Suárez, Dr. Wilfrido Torres y Dr. Juan Carlos Ramírez**, por brindarme su total confianza y haberme permitido la oportunidad de realizar este trabajo, que sin duda ha sido una gran experiencia y un sinfín de herramientas para mi crecimiento profesional. Especialmente quiero agradecer a los doctores **Enrique Márquez Ríos y Carmen Lizette Del Toro Sánchez**, ya que han sido un apoyo excepcional tanto a nivel profesional como personal. No tengo palabras para expresar lo grato que ha sido conocerlos y trabajar con ustedes. Yo creo que no terminaré de agradecerles por su paciencia, ánimos y disposición, sobre todo todas las veces que se dieron el tiempo para todo lo que implican los ensayos, correcciones, dudas o simplemente escuchar y estar ahí, que gracias a ello fue posible fortalecer la confianza y el valor de seguir adelante. Los quiero mucho, todo este enriquecimiento ha sido posible gracias a ustedes. También se les agradece a los compañeros de *Antioxidantes Team* y *Protein Team*: **Iván González, Liliana Pérez, Claudia Murrieta, Jesús Encinas, Fernanda González, Aline Reyes**. Gracias a **Santiago Valdez** por su apoyo durante su estancia de verano, aprendí mucho de usted con sus preguntas infinitas.

Un especial agradecimiento a los compañeros del Laboratorio de Análisis Generales: **M.C. Guillermo Rodríguez Olibarría, Dra. Ofelia Rouzaud Sáñez y Dr. Enrique Márquez Ríos**. También a los acoples: **Dr. Saúl Ruiz Cruz y Alba Mery Garzón García**. A ustedes muchísimas gracias por hacer más agradable el ambiente de trabajo, por el café (colado, de emergencia, o el de enfrente) y la micha de los cochitos. Ustedes saben el enorme aprecio que se les tiene.

Muchas gracias al **Dr. Francisco Rodríguez Felix** y a sus estudiantes: **Agustín Tapia, Carlos Barreras, Freddy Abarca, Daniela Castro**, les agradezco su disposición y apoyo en algunas técnicas. Gracias, Freddy, por tu valiosa aportación y conocimiento.

Muchas gracias al **Dr. Josué Elías Juárez** y a su estudiante **Marisol Gastelum**, por su valioso apoyo y aportación, y por facilitarnos el acceso y uso de los equipos.

Muchas gracias al **Q.B. César Otero** por toda su ayuda. Usted ha estado presente en gran parte de mi formación académica, desde inicios de la preparatoria hasta los últimos cursos de la licenciatura. Ha sido un gusto volver a coincidir en labores. Muchas gracias por su buen humor y por estar al pie del cañón en todo momento. Gracias inmensas a la **Dra. Ana Ledesma** por su disposición, confianza y todo el apoyo brindado. Muy agradecida por sus consejos y palabras.

Muchas gracias a los doctores **Machuy (María Moreno Vásquez), Raymundo E. Picos** y **Efraín Alday**, que el café y las buenas lecturas abunden y nos acompañen en todo momento y lugar.

A mis compañeros de generación: a todos ustedes muchas gracias por su agradable compañía, sé que fue poco el tiempo en el que realmente convivimos, pero les agradezco la paciencia y amabilidad que mostraron durante estos dos años. Me llevo buenos recuerdos con todos y cada uno de ustedes.

A mis amigos de QB, la ex-clica del benceno: **Roxanna Ortega** (siempre princesa, nunca inprincesa), **Alan Meda** (el no-químico), **Francisco Flores, Enrique Enríquez, Daniel Varela, Milagros Álvarez, Carolina Leyva**; a los acoples de Nogales: **Lupita Zárate**; a los acoples de *Hypatia* (la serie): **Paco, Alán, Yosh** y **Picot**. Los quiero mucho, muchas gracias por tanto ocio, vagancia, desvelos, proyecciones alternativas y promoción cultural, sobre todo estar presentes en todo momento, muchas gracias por su apoyo. Seremos extraños y alternativos por lo que nos resta, jeje.

A mis amigos de toda la vida: **Amaranta Morales, Alejandro Gracida, Isabel Morales** y **Eduardo Gutiérrez**. muchas gracias por ser un pilar en mi vida, no saben cuánto los aprecio y valoro todo lo que hemos pasado por tantos años. Y seguimos aquí.

La Chunny no.

DEDICATORIAS

A mis padres:

J. Darío Arredondo López

G. Teresa Parada Arvayo

RESUMEN

El calamar gigante es un molusco cefalópodo de importancia pesquera en varias regiones del Pacífico. Éste se caracteriza por ser una fuente de proteína de alta calidad debido a su fácil digestión y a la presencia de todos los aminoácidos esenciales. No obstante, estudios revelan que las proteínas miofibrilares del calamar gigante poseen propiedades funcionales apropiadas, pero de menor magnitud en comparación con otras especies marinas. Por lo anterior, en el presente estudio se aplicó ultrasonido de alta intensidad (20 kHz; 20 y 40% de amplitud; 0, 1, 3 y 5 min) a una solución de proteína miofibrilar de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (5% p/v) y se determinó su efecto sobre la capacidad y estabilidad espumante. Además, también se realizaron las determinaciones de pH, electroforesis, viscosidad, hidrofobicidad de superficie, tamaño de partícula y potencial zeta. En relación con los resultados, no se observaron cambios significativos en el valor de pH según incrementó el tiempo de aplicación del ultrasonido. En el perfil electroforético, sólo se observaron cambios en el patrón de bandeo en el gel de poliacrilamida nativo. Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la viscosidad y en la hidrofobicidad de superficie, así como una disminución ($p < 0.05$) en el tamaño de partícula y en la carga neta superficial. Lo anterior ayudó a explicar el comportamiento de la proteína sometida al ultrasonido en relación con la propiedad funcional espumante, donde se presentó una tendencia ascendente ($p < 0.05$) tanto en capacidad como en estabilidad espumante. Por lo tanto, la aplicación de este tratamiento representa una alternativa para mejorar la propiedad funcional espumante de proteínas obtenidas del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), sugiriendo una potencial aplicación como aditivo en un sistema alimenticio.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	ii
DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN.....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades del Calamar Gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	3
Producción Pesquera del Calamar Gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	3
Composición Química del Calamar Gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	4
Proteínas Musculares del Calamar.....	4
Proteínas miofibrilares.....	5
Proteínas sarcoplásmicas.....	5
Proteínas estromales.....	6
Propiedades Funcionales de las Proteínas.....	6
Solubilidad de las proteínas.....	7
Capacidad espumante.....	7
Desarrollo de Espumas por Métodos Convencionales.....	7
Ultrasonido.....	8
Clasificación del Ultrasonido de Alta y Baja Intensidad.....	9
Fundamento del Ultrasonido.....	9
Cambios Conformacionales de las Proteínas por Efecto del Ultrasonido.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos.....	12

MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Obtención de Materia Prima.....	13
Obtención de Concentrado Proteico (CP).....	13
Cuantificación de Proteínas.....	13
Aplicación de Ultrasonido al Concentrado Proteico.....	14
Fase 1. Cambios Físicoquímicos de las Proteínas del Concentrado Proteico..	14
Potencial de Hidrógeno (pH).....	14
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	14
Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y	
reductor (SDS-PAGE reductor).....	14
Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (PAGE).....	15
Hidrofobicidad de superficie (So).....	16
Viscosidad de las soluciones proteicas.....	16
Diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula).....	16
Potencial Zeta.....	17
Fase 2. Cambios en la Propiedad Espumante de la Proteína por Efecto del	
Ultrasonido.....	17
Preparación de la espuma.....	17
Capacidad espumante (CE) y estabilidad espumante (EE).....	18
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
Potencial de Hidrógeno (pH).....	20
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	22
Hidrofobicidad de superficie (So).....	30
Viscosidad de las soluciones proteicas.....	34
Diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula).....	39
Potencial Zeta.....	41
Preparación de la Espuma.....	44
Capacidad Espumante (CE).....	44
Estabilidad Espumante (EE).....	46

CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Efecto del ultrasonido sobre los cambios de pH en proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	21
2	Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones desnaturalizantes.....	24
3	Densitograma de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones desnaturalizantes.....	25
4	Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones reductoras.....	26
5	Densitograma de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones reductoras.....	27
6	Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones nativas.....	28
7	Densitograma de proteína de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en condiciones nativas.....	29
8	Efecto del ultrasonido al 20% sobre la hidrofobicidad de superficie (So) de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	32
9	Efecto del ultrasonido al 40% sobre la hidrofobicidad de superficie (So) de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	33
10	Efecto del ultrasonido sobre la curva de viscosidad de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	36
11	Efecto del ultrasonido sobre la curva de flujo de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	37
12	Efecto del ultrasonido sobre la viscosidad de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	38
13	Efecto del ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	40
14	Efecto del ultrasonido sobre la capacidad espumante (CE) de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	45

15	Efecto del ultrasonido al 20% sobre la estabilidad espumante (EE) de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	48
16	Efecto del ultrasonido al 40% sobre la estabilidad espumante (EE) de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Efecto del ultrasonido sobre el potencial zeta de las proteínas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	43

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es la especie de calamar más abundante y de mayor tamaño que se encuentra en la zona pelágica del Pacífico oriental, desde Chile hasta la costa de Oregon. El atractivo comercial de este recurso reside en su gran abundancia, bajo costo, bajo contenido de grasa y el color blanco de su carne, así como también la ausencia de escamas y espinas, siendo el manto la principal región anatómica que se procesa. Además, se caracteriza por presentar un alto rendimiento después de eviscerar (hasta el 75% del total de sus partes, incluyendo los tentáculos), siendo una fuente de proteína de alta calidad debido a su fácil digestión y a la presencia de todos los aminoácidos esenciales. Está documentado que proteínas miofibrilares de calamar gigante, donde destacan actina y miosina, presentan propiedades funcionales apropiadas, tales como emulsificante, gelificante y espumante; sin embargo, dicha funcionalidad es de menor magnitud en comparación con otras especies marinas (Amiri *et al.*, 2018; Higuera-Barraza *et al.*, 2016; Márquez-Álvarez *et al.*, 2015; Murrieta-Martínez *et al.*, 2016).

En términos de composición química, la funcionalidad de las proteínas dentro de un sistema alimenticio se debe a su complejidad en la secuencia de aminoácidos única; por lo que son ingredientes utilizados dentro de una amplia gama de formulaciones. Desde el punto de vista tecnológico, las proteínas cumplen con varios propósitos no nutricionales, como el de proporcionar o estabilizar la estructura característica en los alimentos, que incluye dentro de sus propiedades la capacidad para formar o estabilizar espumas. Las espumas se definen como dispersiones de gas en líquido (g/l) y su estabilidad depende del tipo de proceso que se lleve a cabo para su formación, por lo que su mejora es un área altamente estudiada, ya que se consideran esenciales para el mantenimiento de los atributos organolépticos de los alimentos (Foegeding y Davis, 2011; Higuera-Barraza *et al.*, 2017; O'Sullivan *et al.*, 2017).

Se han empleado métodos físicos y químicos para la modificación de proteínas, con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales. No obstante, las modificaciones

químicas pueden resultar perjudiciales para el valor nutricional de los productos, además de causar efectos adversos para la salud. Por otro lado, las modificaciones físicas han sido ampliamente utilizadas para la mejoría de las propiedades funcionales (Singh *et al.*, 2017). Actualmente ha incrementado el interés sobre el ultrasonido de alta intensidad debido a que su propagación en el material biológico induce la compresión y descompresión de burbujas, que modifican las propiedades fisicoquímicas del material y mejoran la calidad de diversos sistemas (Higuera-Barraza *et al.*, 2017).

En años recientes, se ha reportado la aplicación del ultrasonido para la mejora de la capacidad y estabilidad espumante en diversas fuentes proteicas como la clara de huevo (Stefanovi *et al.*, 2017), carne de pollo (Xue *et al.*, 2018), carne de res (Amiri *et al.*, 2018), trigo (Jambrak *et al.*, 2014), soya (Morales *et al.*, 2015), etc. Se ha reportado que esta tecnología induce cambios conformacionales en la estructura proteica, causando el desplegamiento, como resultado se exponen regiones hidrofílicas hacia la fase acuosa y regiones hidrofóbicas hacia la fase gaseosa (Singh *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios relacionados con la aplicación del ultrasonido y su efecto en la modificación de proteínas de organismos marinos han sido escasamente reportados (Higuera-Barraza *et al.*, 2017).

Por lo anterior, la presente investigación plantea estudiar el efecto de los pulsos ultrasónicos sobre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su capacidad para mejorar la propiedad funcional espumante.

ANTECEDENTES

Generalidades del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un molusco cefalópodo de importancia pesquera en varias regiones del Pacífico, desde el sur de California en los Estados Unidos hasta el sur de Chile. La mayoría de la producción nacional se exporta, principalmente a los mercados asiáticos y sólo el 20% del volumen de captura total se vende en el mercado nacional. Esta especie resulta una fuente atractiva para la producción de concentrados proteicos, debido a su abundancia y a las características intrínsecas de su músculo. Su procesamiento adecuado puede dar como resultado productos enriquecidos; sin embargo, se tiene un escaso conocimiento sobre sus características fisiológicas e intrínsecas, por lo que su procesamiento sigue en desarrollo (Encinas-Arzate *et al.*, 2014; Murrieta-Martínez *et al.*, 2016; Valencia-Pérez *et al.*, 2008).

Producción Pesquera del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

En la actualidad, México ocupa el séptimo lugar en producción de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) a nivel mundial (FAO, 2016). Cabe mencionar que esta especie aún se considera abundante en el estado de Sonora, a pesar de que su captura anual ha disminuido en su volumen desde el año 2008 (26,216 toneladas al año); en la actualidad su captura es menor a 200 toneladas al año, lo cual se ha atribuido a patrones de migración (SAGARPA-CONAPESCA, 2017). La población de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Océano Pacífico presenta patrones de migración a aguas territoriales mexicanas y sale del Golfo de California según sus requisitos de alimentación, lo cual afecta su disponibilidad y accesibilidad. La mayor parte del calamar se encuentra en movimiento dentro del Golfo de California y su migración se dirige hacia América del Sur (Morales-Bojórquez *et al.*, 2001). A nivel mundial, su

volumen de captura ha incrementado en otros países, siendo Perú el país con la mayor captura en todo el mundo con un volumen entre 500-600,000 toneladas anuales. Chile y China son los otros dos grandes productores de calamar gigante, teniendo un volumen de captura de 200,000 y 250,000-300,000 toneladas anuales, respectivamente (Mereghetti, 2017).

Composición Química del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

La composición química del manto es similar a la de los peces magros, aunque ésta puede variar según la época de captura y la edad del calamar. Sin embargo, las proteínas del músculo difieren a las de los vertebrados marinos, debido a características inherentes de sus proteínas miofibrilares, que son más solubles en agua y su disposición también es diferente. Por otro lado, son menos susceptibles a la congelación y más propensas a la desnaturalización térmica (De La Fuente-Betancourt *et al.*, 2008; Murrieta-Martínez *et al.*, 2016).

Proteínas Musculares del Calamar

El manto del calamar se encuentra conformado por fibras musculares circulares, que se interrumpen por secciones de fibras orientadas radialmente a intervalos regulares, que cumplen con la función de contraer el manto y hacer que la cavidad de éste se extienda según la fuerza de golpe de las fibras circulares. Los principales componentes interiores de la fibra muscular son las fibrillas (miofibrillas), que constituyen el aparato contráctil. Éstas se encuentran envueltas por el sarcoplasma y algunos elementos como las mitocondrias, túbulos T y el retículo sarcoplásmico. Las principales proteínas del músculo son miosina, actina, paramiosina, tropomiosina y troponina; éstas son solubles en soluciones salinas concentradas, constituyendo alrededor del 50-80% de la masa proteica muscular; además son las responsables de transformar la energía química en mecánica durante la contracción y relajación del músculo (Badui, 2006; Fennema, 2008; Lehninger, 2009). Las proteínas son el

principal componente que constituye el tejido muscular, las cuales influyen en la textura, según sean su tipo y su estado funcional. Éstas desempeñan un papel importante en la calidad nutricional de los alimentos cárnicos y pueden clasificarse según su solubilidad como miofibrilares, sarcoplásmicas y estromales (Moral *et al.*, 2002).

Proteínas miofibrilares

La fracción miofibrilar es soluble en solución de alta fuerza iónica (0.5 M) y constituye el 75-85% de la misma, siendo la miosina su principal componente, seguida de la actina y paramiosina. Ésta última es particularmente común en los invertebrados marinos y puede representar hasta el 25% de las proteínas miofibrilares (Moral *et al.*, 2002; Murrieta-Martínez *et al.*, 2016). La miosina es una proteína rica en lisina y ácido glutámico, que representa el mayor constituyente de las proteínas miofibrilares y se encuentra conformada por seis subunidades, dentro de las cuales se encuentran presentes dos cadenas pesadas y cuatro ligeras. Las primeras constituyen la mayor parte de la estructura y se disponen como hélices α extendidas en su extremo carboxilo terminal, unas sobre otras con un super enrollamiento levógiro que forma una fibra del tipo de la α -queratina. Por otro lado, la actina es la segunda proteína miofibrilar de importancia, la cual se encuentra presente en dos tipos de fracciones: fibrosa y globular. La segunda consta de aproximadamente 450 aminoácidos con un peso molecular de 46,000 Da; presenta un 30% de conformación de α -hélice. La actina globular se asocia para formar polímeros filamentosos largos en presencia de magnesio que, junto con la miosina, forman el complejo actomiosina en la contracción muscular (Badui, 2006; Fennema, 2008; Lehninger, 2009).

Proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas representan del 20 al 40% del total de las proteínas musculares. Estas proteínas son fundamentalmente globulinas y albúminas que presentan solubilidad en agua y soluciones salinas diluidas. Se constituyen

principalmente por enzimas implicadas en el metabolismo celular, como las catepsinas, creatina quinasa, mioglobina, etc (Badui, 2006; López-Enríquez *et al.*, 2015).

Proteínas estromales

La fracción estromal es insoluble y se compone principalmente de tejido conectivo, representando aproximadamente el 11% del total de proteína. Su principal constituyente es el colágeno compuesto mayoritariamente por glicina (33%), prolina (12%), alanina (11%) e hidroxiprolina (10%), siendo deficiente principalmente en lisina y triptófano. En términos de composición química, el tropocolágeno, su monómero, se integra de tres cadenas polipeptídicas de peso molecular de 100,000 Da cada una, que en conjunto forman una triple hélice; las tres proteínas se enlazan entre sí a través de uniones intermoleculares cruzadas que le confieren gran rigidez a la estructura y baja solubilidad; a su vez, la interacción de las moléculas de tropocolágeno produce fibras que dan origen al colágeno propiamente dicho (Badui, 2006; Murrieta-Martínez *et al.*, 2016).

Propiedades Funcionales de las Proteínas

En su forma más simple, las propiedades funcionales de las proteínas se definen como aquellas características fisicoquímicas que afectan y modifican el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el almacenamiento, cocción y consumo. Éstas representan interacciones complejas entre la conformación, estructura y composición de las proteínas bajo la influencia de otros componentes de los alimentos y el medio ambiente. Las proteínas cumplen con varios propósitos no nutricionales, como el de proporcionar o estabilizar la estructura característica en alimentos. Dentro de las principales propiedades funcionales de las proteínas incluye la capacidad para formar o estabilizar geles, emulsiones y espumas (Foegeding y Davis, 2011; Mirmoghtadaie *et al.*, 2016).

Solubilidad de las proteínas

La solubilidad de una proteína describe la capacidad para formar soluciones coloidales. Ésta depende del estado fisicoquímico de sus moléculas, que puede verse alterada por calentamiento, procesamiento, secado y las condiciones de almacenamiento. La solubilidad de la mayor parte de las proteínas dependerá del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos (Pilosof y Bartholomai, 2000).

Capacidad espumante

La espuma es un sistema de dos fases, el cual se describe como gas en dispersiones líquidas (celdas de aire separadas por una capa líquida continua llamada lamela) (g/l) o como gas en dispersiones sólidas (g/s). Las espumas en alimentos son un sistema complejo, el cual incluye una mezcla de gases, líquidos, sólidos y tensoactivos. En su forma más simple, una espuma consiste en una burbuja de gas dispersa rodeada por una fase continua, dentro de la cual pueden encontrarse las proteínas. Las proteínas, por su carácter anfipático, tienen la capacidad de formar películas interfaciales debido a la interacción con proteínas adyacentes que se adsorben en interfases fluidas, lo que le confiere distintas propiedades tales como espesor, permeabilidad y viscoelasticidad. Esto desempeña un papel importante en la formación y estabilidad de los sistemas dispersos en alimentos, como son las espumas (Foegeding y Davis, 2011; Morales *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2017).

Desarrollo de Espumas por Métodos Convencionales

Las proteínas contribuyen en la formación de espuma debido a su rápida adsorción en las interfases aire/agua, reduciendo la tensión interfacial y alterando la viscosidad

de la fase continua. Los alimentos que contienen estructuras a base de espuma deben considerarse en el contexto de tres etapas importantes y parcialmente distintas: formación, estabilidad y drenado (Foegeding y Davis, 2011).

La formación de espumas con proteínas implica un proceso de desnaturalización parcial, ya que debe presentarse un desplegamiento de la estructura proteica para que, de esta manera, los aminoácidos hidrofóbicos queden orientados hacia el interior de la burbuja y los hidrofílicos hacia el exterior, en contacto con la fase acuosa. Por otro lado, una desnaturalización excesiva producida por un proceso de calentamiento drástico reduce su capacidad de espumado debido a que promueve la formación de agregados, que se ve reflejado en el colapso y drenado del sistema. Sin embargo, en el caso de algunos tipos de proteínas se ha observado que un calentamiento gradual hasta alcanzar temperaturas elevadas puede estabilizar la espuma debido a que ésta coagula en forma de película, estableciendo una lamela más resistente, casi sólida. La incorporación de aire en la fase acuosa puede realizarse de dos maneras: por dispersión o por condensación. En el primer caso, el aire se inyecta directamente sobre la fase líquida mediante boquillas o por un batido vigoroso del medio líquido. En el segundo caso se utiliza aire presurizado que se disuelve en la fase líquida a espumar, que, al liberarse la presión, la expansión del aire forma la espuma (Badui, 2006).

Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología relativamente nueva que resulta de interés para la industria alimenticia, ya que puede mejorar las propiedades químicas, físicas y funcionales de diversos alimentos. Esto se debe a la presencia de fenómenos físicos y químicos ocasionados por la cavitación. Algunas fuerzas físicas involucradas en la cavitación son la agitación mecánica, fuerzas de corte, ondas de choque, puntos de calentamiento, entre otros. Dentro del ambiente térmico generado dentro de las burbujas de cavitación conduce a la generación de una variedad de reacciones químicas, incluyendo la formación de radicales altamente reactivos. El ultrasonido se

define como una onda acústica que genera regiones de alta y baja presión causando variación en la presión acústica la cual es directamente proporcional a la cantidad de energía aplicada al sistema. Éste puede clasificarse en dos categorías: ultrasonido de alta y baja intensidad (Ashokkumar, 2015; Chemat *et al.*, 2011; Higuera-Barraza *et al.*, 2016).

Clasificación del Ultrasonido de Alta y Baja Intensidad

El ultrasonido es una tecnología que se basa en ondas acústicas que tienen una frecuencia superior al umbral de detección del oído humano (>20 kHz), el cual puede clasificarse según sea su intensidad: 1) baja intensidad (1 W/cm²) con frecuencia de 5-10 MHz, utilizada para la uso diagnóstico en medicina, y 2) alta intensidad (10-1000 W/cm²) con frecuencia de 20-100 kHz, cuyo empleo tiene la finalidad de modificar las propiedades fisicoquímicas de los alimentos (Malik *et al.*, 2017).

Fundamento del Ultrasonido

Los efectos del ultrasonido sobre las estructuras alimenticias se relacionan con la cavitación, calentamiento, agitación dinámica, esfuerzo cortante y turbulencia. El efecto de cavitación consiste en la rápida formación y colapso de burbujas de gas que ocasiona un aumento de la temperatura en el sitio del colapso debido a cambios de presión localizados que ocurren en períodos de tiempo corto (en microsegundos). Las ondas acústicas se generan a partir de la conversión de energía eléctrica en energía mecánica por medio de un transductor, el cual oscila en respuesta a la energía eléctrica y por una punta (parte del sonotrodo) que produce vibraciones mecánicas (Morales *et al.*, 2015; O'Sullivan *et al.*, 2017).

Cambios Conformacionales de las Proteínas por Efecto del Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología no destructiva que se aplica para la modificación estructural de las proteínas mediante ondas sonoras, que se utilizan para la mejora de la calidad y las propiedades fisicoquímicas. Se ha demostrado que el ultrasonido tiene un efecto positivo en la propiedad espumante, viéndose incrementada su estabilidad debido a que su aplicación induce la dispersión de las partículas de proteína con mayor uniformidad. Además causa su desplegamiento y expone sus grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que son esenciales para la adsorción de proteínas en la interfase en un sistema coloidal (Mirmoghtadaie *et al.*, 2016). En este sentido, se encuentra documentado que el ultrasonido tiene un efecto sobre la estructura espacial de la proteína a nivel secundario, induciendo el despliegue de la región α helicoidal y, consecuentemente, la formación de láminas β , giros β y contenidos desordenados. También puede presentarse otro tipo de comportamiento, como un incremento de las conformaciones α helicoidales y un descenso en las conformaciones de láminas β y contenido desordenado. El tipo de comportamiento depende de las características inherentes de cada fuente proteica que no solamente depende de su secuencia de aminoácidos, sino también del tipo de interacciones que se encuentren presentes en cada región de la proteína que, al interrumpirse por efecto del ultrasonido, las estructuras en su forma nativa sufrirían un rearrreglo espacial (Hu *et al.*, 2013; Li, Kang, Zhao, Xu, & Zhou, 2014). No obstante, el ultrasonido también puede generar la formación de radicales libres y superóxidos debido al rompimiento de la molécula de agua, lo cual puede conducir a la formación de agregados proteicos en un medio acuoso. La formación de peróxido por efecto de la cavitación puede conducir a la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres a ácido sulfínico resultando indeseable. Por lo anterior, es importante el conocimiento del funcionamiento de esta tecnología para la correcta selección y estandarización de los parámetros que generarán una espuma con la calidad aceptable de sus atributos sensoriales en un producto alimenticio (Mirmoghtadaie *et al.*, 2016).

HIPÓTESIS

La aplicación de pulsos ultrasónicos de alta intensidad mejora la capacidad espumante de las proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los pulsos ultrasónicos sobre la propiedad espumante de las proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la aplicación de pulsos ultrasónicos sobre los cambios fisicoquímicos de las proteínas.
2. Determinar el efecto de los pulsos ultrasónicos sobre la propiedad espumante de las proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Materia Prima

Se utilizó manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) obtenido de un comercio local en Hermosillo, Sonora. Posterior a su compra, se llevó directamente al Laboratorio de Análisis Generales del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. Los mantos se mantuvieron en condiciones de congelación a -20 °C hasta su posterior utilización.

Obtención de Concentrado Proteico (CP)

Las muestras de calamar se descongelaron a 4-5 °C durante 24 h, para posteriormente proceder a la obtención de un concentrado proteico (CP) según la metodología descrita por Higuera-Barraza *et al.* (2017). Para ello, se homogeneizó el manto con agua destilada en relación 1:3 (manto: agua destilada) y se centrifugó a 10,375 g durante 30 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada (Sorvall Biofugue Stratos, Thermo Scientific, Darmstadt, Hesse, Alemania). Se descartó el sobrenadante y el precipitado resultante se consideró como CP y se almacenó en refrigeración a 2 °C hasta su uso.

Cuantificación de Proteínas

Se determinó el contenido de proteína en el CP mediante el método descrito por la AOAC (2005).

Aplicación de Ultrasonido al Concentrado Proteico

Se desarrollaron soluciones de 100 mL de proteína a una concentración de 5 mg/mL. Una vez preparadas las soluciones, se les aplicó ultrasonido pulsado en 4 tiempos diferentes (0, 1, 3 y 5 min; 20 y 40% de amplitud). Para su aplicación, se hizo uso de un ultrasonicador SFX 550 (Branson Digital Sonifier, Danbury, Connecticut, USA) provisto de un piezoeléctrico con punta de 12.7 mm de diámetro, de acero inoxidable.

Fase 1. Cambios Fisicoquímicos de las Proteínas del Concentrado Proteico

Potencial de Hidrógeno (pH)

La medición del potencial de hidrógeno (pH) se realizó con el objetivo de determinar la concentración de iones de hidrógeno presente en las muestras y de la que presentarían por efecto de la aplicación del ultrasonido. La medición del pH se realizó según la metodología descrita por Woyewoda (1986). Se utilizó un Seven Easy pH meter (Mettler Toledo, UK). Previo a su utilización, el equipo se calibró con los buffers estándar de pH conocido (4, 7 y 10). Los valores obtenidos se reportaron como el promedio y la desviación estándar de tres repeticiones.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y reductor (SDS-PAGE reductor). La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó con la finalidad de determinar si existe un cambio en el perfil de peso molecular de las proteínas presentes en el concentrado proteico (CP) por efecto del tratamiento aplicado. Para su realización se siguió la metodología descrita por Laemmli (1970), donde cada muestra se mezcló con un buffer muestra, en una relación 1:1, se homogeneizaron y cargaron 11.25 µg de proteína por cada tratamiento, utilizando una unidad para electroforesis Mini PROTEAN ®3 Cell Multi-casting (Bio-Rad

Laboratories, Hércules, CA). Se utilizó una mezcla de proteínas estándar de alto rango (Sigma Aldrich®), compuesta por las siguientes proteínas: cadena pesada de miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), albúmina de suero bovino (66 kDa), glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), lactoalbúmina (14.2 kDa) y aprotinina (6.5 kDa). La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura ambiente a un voltaje de 100 volts. Finalmente, las bandas se tiñeron con azul coomassie al 0.05% y se destiñeron en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 7%. Se realizó un densitograma de las muestras a partir de los geles SDS-PAGE y SDS-PAGE reductor en función de la cantidad relativa de cada carril derivado de la densidad óptica, y se usó el programa Quantity One (versión 4.6.9).

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativo (PAGE). Para la realización de la electroforesis en condiciones nativas, se siguió de manera similar el protocolo descrito en la sección anterior, donde cada muestra se mezcló con buffer muestra, sin la adición de SDS ni 2-mercaptoetanol, en relación 1:1. Las muestras se homogenizaron sin ser sometidas a un tratamiento térmico, y cargaron 11.25 μ g de proteína por cada tratamiento, utilizando una unidad para electroforesis Mini PROTEAN®3 Cell Multi-casting (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Se utilizó una mezcla de proteínas estándar nativa (Sigma Aldrich®) compuesta por las siguientes proteínas: ureasa (hexámero, 545 kDa; trímero, 272 kDa), albúmina de suero bovino (dímero, 132 kDa; monómero, 66 kDa), albúmina de clara de huevo (45 kDa). La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura ambiente a un voltaje de 80 volts. Finalmente, las bandas se tiñeron con azul coomassie al 0.05% y se destiñeron en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 7%. Se realizó un densitograma de las muestras a partir de los geles PAGE en función de la cantidad relativa de cada carril derivado de la densidad óptica, y se usó el programa Quantity One (versión 4.6.9).

Hidrofobicidad de superficie (So)

La hidrofobicidad de superficie de la proteína permite conocer el grado de exposición y desplegamiento de los residuos apolares que se relaciona con cambios conformacionales. Para su determinación se preparó una solución madre de proteína (5 mg/mL) y a partir de ésta se prepararon soluciones en concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/mL. Se tomaron 3 mL de cada una de las soluciones y se les adicionó 80 μ L de 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS) dejando reposar en ausencia de luz por 15 min. Posteriormente se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Agilent Technologies; Cary Eclipse; California, USA) a una longitud de onda de excitación/emisión de 370/490, respectivamente. El índice de hidrofobicidad de superficie (So) resultó de la pendiente del gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de proteína (% p/v) (Alizadeh-Pasdar y Li-Chan, 2000).

Viscosidad de las soluciones proteicas

La determinación de la viscosidad permite conocer el estado de dispersión de la proteína que se relaciona con cambios en la solubilidad. La medición permitió identificar si el tratamiento del ultrasonido pulsado afectó la viscosidad de la proteína, así como la posible formación de agregados y su efecto en la funcionalidad de la proteína. Se siguió la metodología propuesta por Morris (1981) donde se hizo uso de un Reómetro Anton Parr MCR 102, partiendo de una concentración preestablecida de proteína (5 mg/mL) a 25 °C. Se utilizó un volumen de 19 mL a los que se le aplicó una tasa de corte de 0.1-450 S^{-1} .

Diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula)

La medición del diámetro permite observar los cambios en el tamaño de partícula por efecto del tratamiento de ultrasonido pulsado, así como la uniformidad del tamaño de las partículas. Para esto, se siguió la metodología propuesta por Gordon y Pilosof

(2010) donde se hizo uso de un dispersor dinámico de luz láser Mastersizer 2000 (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) para determinar el tamaño de partícula por espectrometría de correlación fotónica y dispersión de luz con un rango de detección de 0.02 a 2000 μm . La muestra de proteína (5 mg/mL) se diluyó en relación 1:100 (proteína: agua destilada). Posteriormente, se colocó en una cubeta desechable 101-QS y se realizaron tres mediciones por muestra a 633 nm (se tomaron 10 lecturas de cada muestra) a una temperatura constante de 25 °C. De los datos obtenidos, se generaron gráficos expresados en la intensidad del haz de luz (%) vs el radio del tamaño de partícula (nm) que se detectó por espectrometría.

Potencial Zeta

La determinación de este parámetro se realizó con la finalidad de conocer la carga y el estado de dispersión de las proteínas, que se relaciona con los cambios fisicoquímicos del sistema coloidal. Se siguió la metodología propuesta por Arzeni (2015) utilizando un equipo Mastersizer 2000 (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcesterhire) con ángulo fijo de 17 °. Las soluciones de proteína pulsadas se diluyeron en relación 1:100 y, posteriormente, se colocaron en una celda especial con electrodos (DTS 106C, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Finalmente, se obtuvo la media de tres mediciones.

Fase 2. Cambios en la Propiedad Espumante de la Proteína por Efecto del Ultrasonido

Preparación de la espuma

A partir de las soluciones proteicas [5 mg/mL] previamente tratadas con ultrasonido de pulsos (a 0, 1, 3 y 5 min), fue que se prepararon las espumas mediante la metodología propuesta por López-Enríquez (2015). Una vez formados los diferentes

sistemas coloidales, se determinó la capacidad espumante de la proteína a través de diferentes metodologías que se describen a continuación.

Capacidad espumante (CE) y estabilidad espumante (EE)

Se tomaron 20 mL de solución de proteína y se homogeneizaron en una probeta graduada a 5,000 rpm por 1 min, utilizando un homogeneizador de tejidos (OMNI GLH850; Kennesaw, United States) con un tamaño de punta de 20 mm x 195 mm, que se introdujo a 1 cm de profundidad. Inmediatamente se calculó el volumen de la espuma generada a los 30 s después de su elaboración. El incremento de volumen se expresó como porcentaje de capacidad espumante (CE) y se calculó con la siguiente ecuación:

$$CE (\%) = \frac{\text{Volumen de espuma después de 30 s (mL)}}{\text{Volumen líquido inicial (mL)}} \times 100$$

La estabilidad espumante (EE) se midió cada hora durante 6 horas y se calculó como porcentaje de espuma restante después de 1 h a 25 °C, utilizando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Volumen de espuma (mL) restante después de 1 h}}{\text{Volumen de espuma después de 30 s (mL)}} \times 100$$

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los datos se analizaron a través de un arreglo multifactorial, donde los factores principales fueron: amplitud y tiempo de aplicación de ultrasonido. El primero con dos niveles (20 y 40% de amplitud) y el segundo con cuatro niveles (0, 1, 3 y 5 min).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con comparaciones múltiples de Tukey usando un nivel de significancia del 5%. Se llevaron a cabo tres

repeticiones del experimento y cada determinación se realizó por triplicado. Los datos se analizaron usando el programa SPSS versión 22.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial de Hidrógeno (pH)

Los valores de la medición de pH se muestran en la Figura 1. Para todos los tratamientos no se observaron cambios en el valor de pH de las soluciones proteicas ($p > 0.05$). Se sugiere que las condiciones de los tratamientos aplicados no fueron lo suficientemente drásticas como para inducir un desequilibrio en la formación de iones hidrógenos libres (H^+) o la ionización del sistema agua-proteína. Esto coincide con lo reportado por Higuera-Barraza *et al.* (2017), que aplicaron ultrasonido (20 kHz; 20 y 40%; 30, 60, 90 s) en solución de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (5 mg/mL) y no se observaron cambios en este parámetro, debido a que las condiciones de ultrasonido aplicadas no promovieron la ionización de los grupos ionizables de las proteínas o la hidrólisis de éstas. Lo anterior difiere con lo reportado por Amiri *et al.* (2018), que aplicaron ultrasonido (20 kHz; 100 y 300 W; 10, 20 y 30 min) a una solución de proteína miofibrilar de tejido muscular de res (*Longissimus dorsi*) (3% p/v), donde el pH incrementó a medida que aumentó el tiempo de aplicación de ultrasonido. Lo anterior se le atribuye al fenómeno de cavitación, donde se genera un incremento local de la presión y temperatura en el sitio de colapso de las burbujas de cavitación, que induce el desplegamiento de la proteína y la formación de radicales libres, mismos que interaccionan con los aminoácidos ácidos de la cadena lateral de las proteínas, ocasionando una predominancia de los aminoácidos básicos.

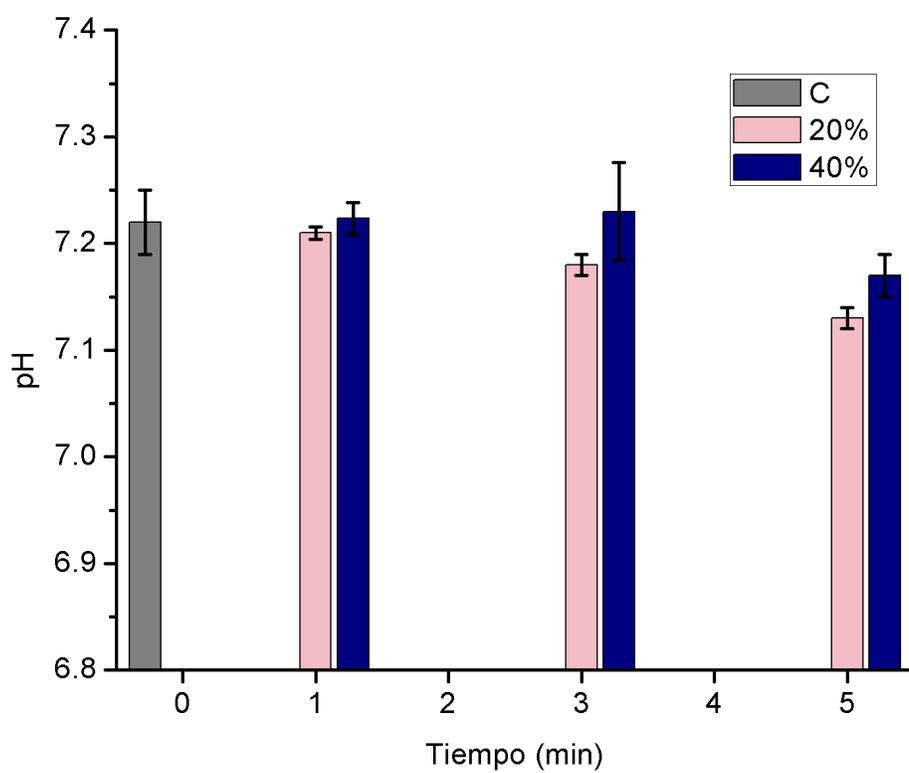


Figura 1. Efecto del ultrasonido sobre los cambios de pH en proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

Los efectos de la aplicación de ultrasonido sobre el perfil electroforético de las soluciones de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones desnaturizantes y reductoras, se muestran en la Figura 2 y 4, respectivamente. Se observan las principales bandas descritas para esta especie, que son la cadena pesada de miosina (CPM) (~200 kDa), meromiosina pesada (MMP) (~130 kDa), paramiosina (PM) (~97 kDa), meromiosina ligera (MML) (~70 kDa), actina (ACT) (~45 kDa) y tropomiosina (TM) (~38-41 kDa) (Lv *et al.*, 2017; Tolano-Villaverde *et al.*, 2017). La aplicación de ultrasonido sobre la proteína no mostró cambios en el patrón de bandas para ambos geles, lo que sugiere que las condiciones establecidas de tiempo y amplitud del ultrasonido no fueron lo suficientemente drásticas para generar la formación de puentes disulfuro o la ruptura de enlaces peptídicos, ni la formación de agregados mediante la formación de enlaces covalentes distintos a los S-S. Esto puede corroborarse con sus respectivos densitogramas (Figura 3 y 5). Lo anterior coincide con lo previamente reportado por Singh *et al.* (2017), quienes evaluaron el efecto del ultrasonido (20 kHz; 70%; 30 min) en una solución proteica a partir de ovario de calamar (*Loligo formosana*) en geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras, donde no se mostraron cambios en el patrón de bandeo. En otro estudio, Higuera-Barraza *et al.* (2017) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 20 y 40%; 30, 60 y 90 s) a una solución proteica de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y evaluaron su efecto en geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes, donde el patrón de bandeo no mostró cambios respecto al control. Cabe señalar que, el no encontrar cambios en el patrón de bandeo es lo esperado, ya que esto indica que el tratamiento no es drástico y no promueve la hidrólisis proteica ni la formación de agregados.

Respecto al gel en condiciones nativas (Figura 6), se observan las principales bandas reportadas para esta especie, que son miosina (MIO) (~500 kDa), paramiosina (PM) (~220 kDa) y actina (ACT) (~43-50 kDa) (Tolano-Villaverde *et al.*, 2017). La aplicación de ultrasonido sobre la proteína mostró cambios en el patrón de

bando, con la aparición de bandas debajo de la banda de miosina (MIO), según fue incrementando tanto el tiempo como amplitud de ultrasonido. Esto sugiere que las condiciones establecidas de tiempo y amplitud promovieron el rompimiento de interacciones electrostáticas o de Van der Waals que conforman los agregados proteicos, apareciendo dos bandas nuevas debajo de la banda descrita para miosina, que podrían sugerirse como la cadena ligera de miosina y meromiosina; lo cual se corrobora en el densitograma con la aparición de nuevos picos debajo del pico descrito para miosina (Figura 7).

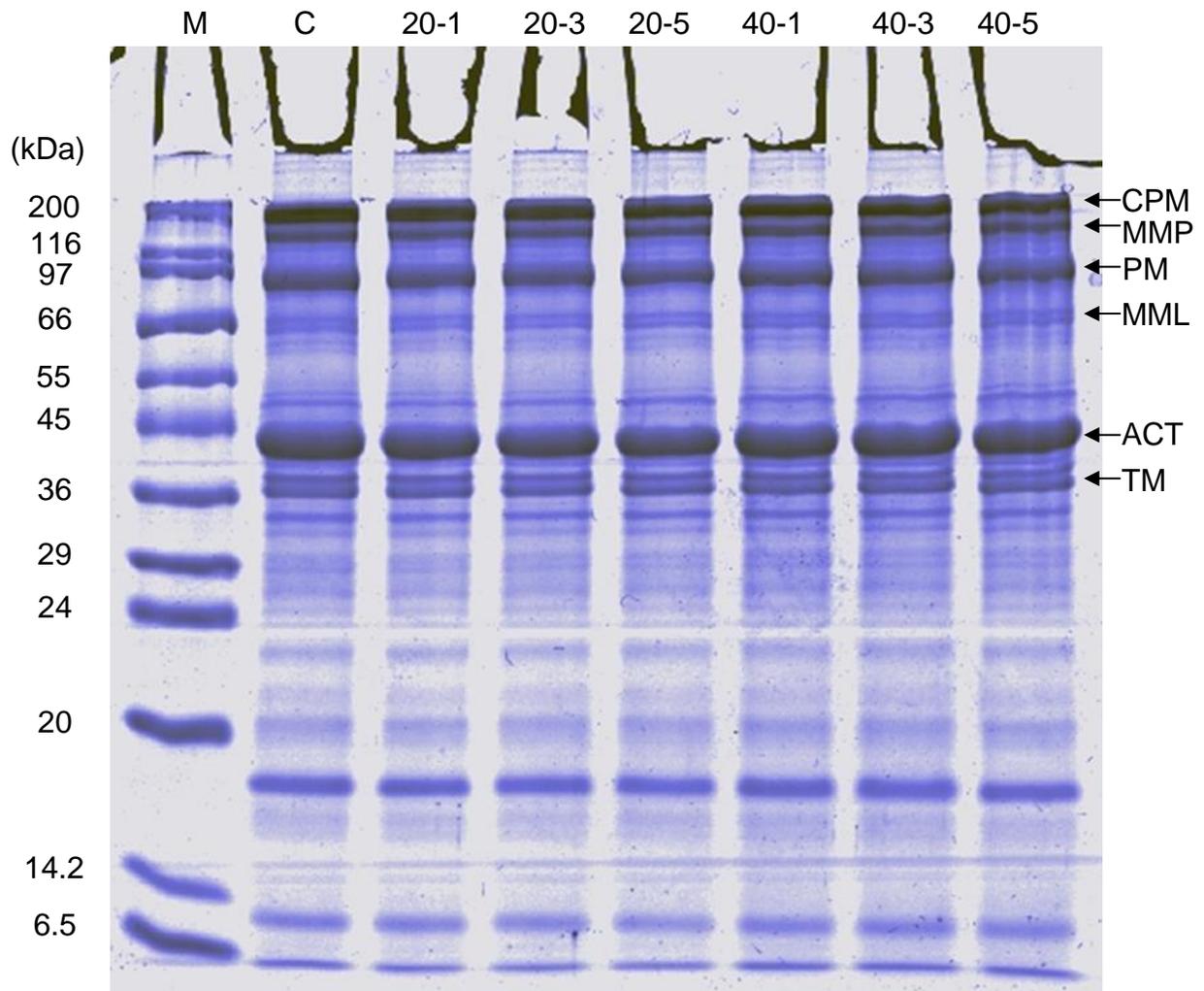


Figura 2. Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones desnaturizantes. Carril M, Marcador; C, Control; 20-1, 20%-1 min; 20-3, 20%-3 min; 20-5, 20%-5 min; 40-1, 40%-1 min; 40-3, 40%-3 min; 40-5, 40%-5 min.

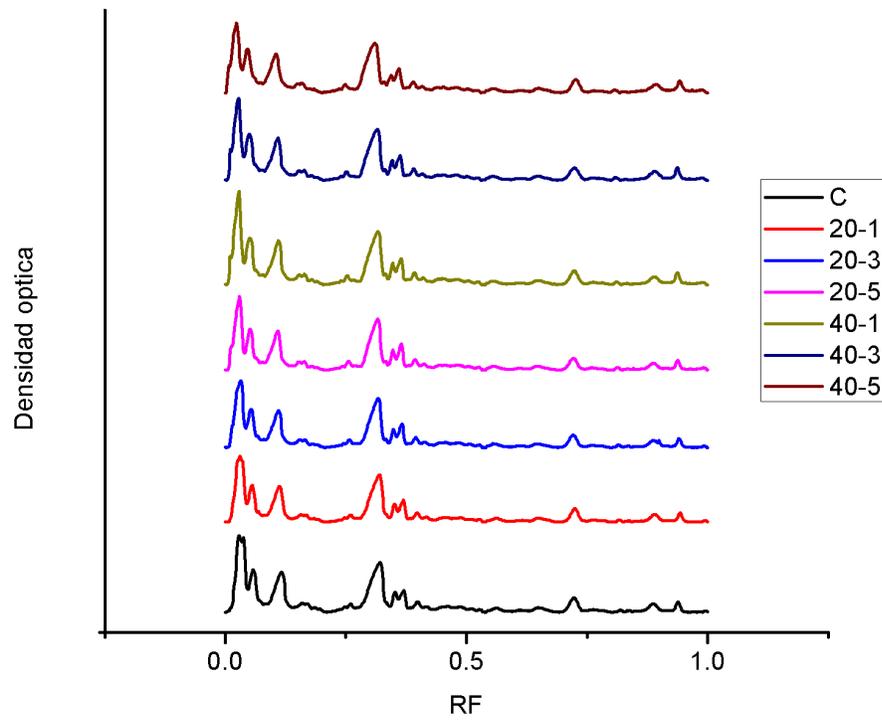


Figura 3. Densitograma de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones desnaturizantes. Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

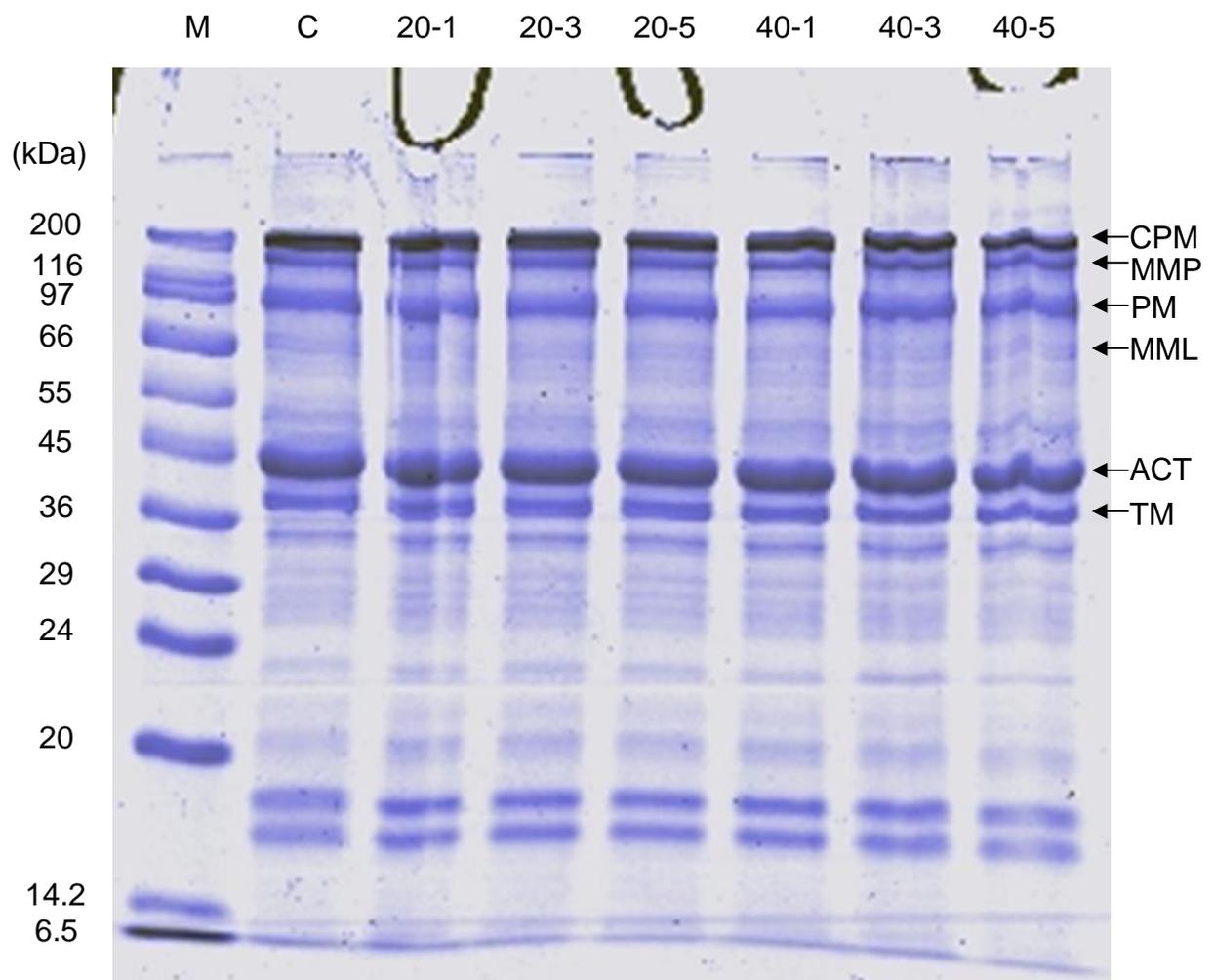


Figura 4. Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones reductoras. Carril M, Marcador; C, Control; 20-1, 20%-1 min; 20-3, 20%-3 min; 20-5, 20%-5 min; 40-1, 40%-1 min; 40-3, 40%-3 min; 40-5, 40%-5 min.

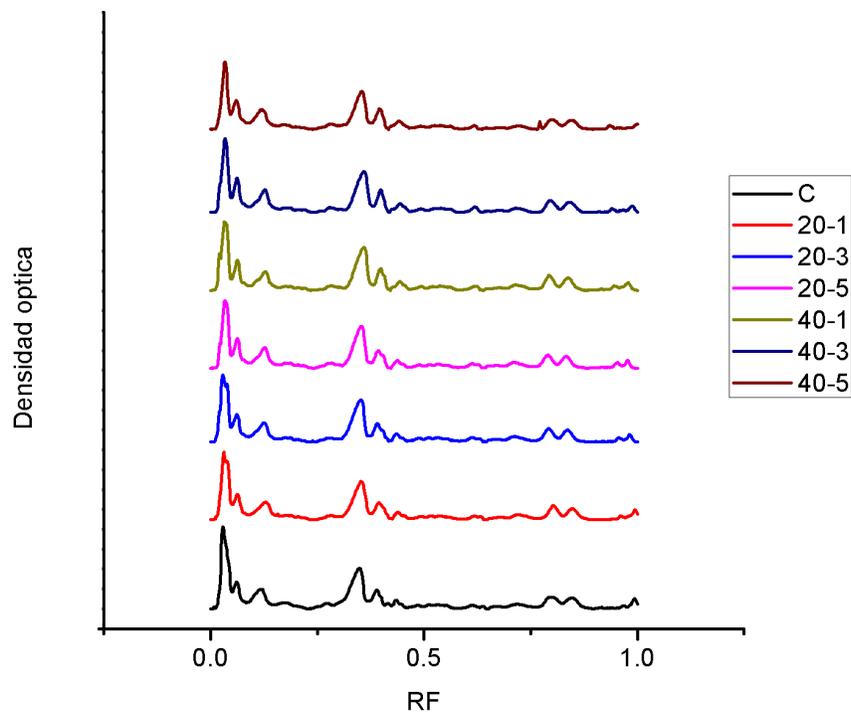


Figura 5. Densitograma de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones reductoras. Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

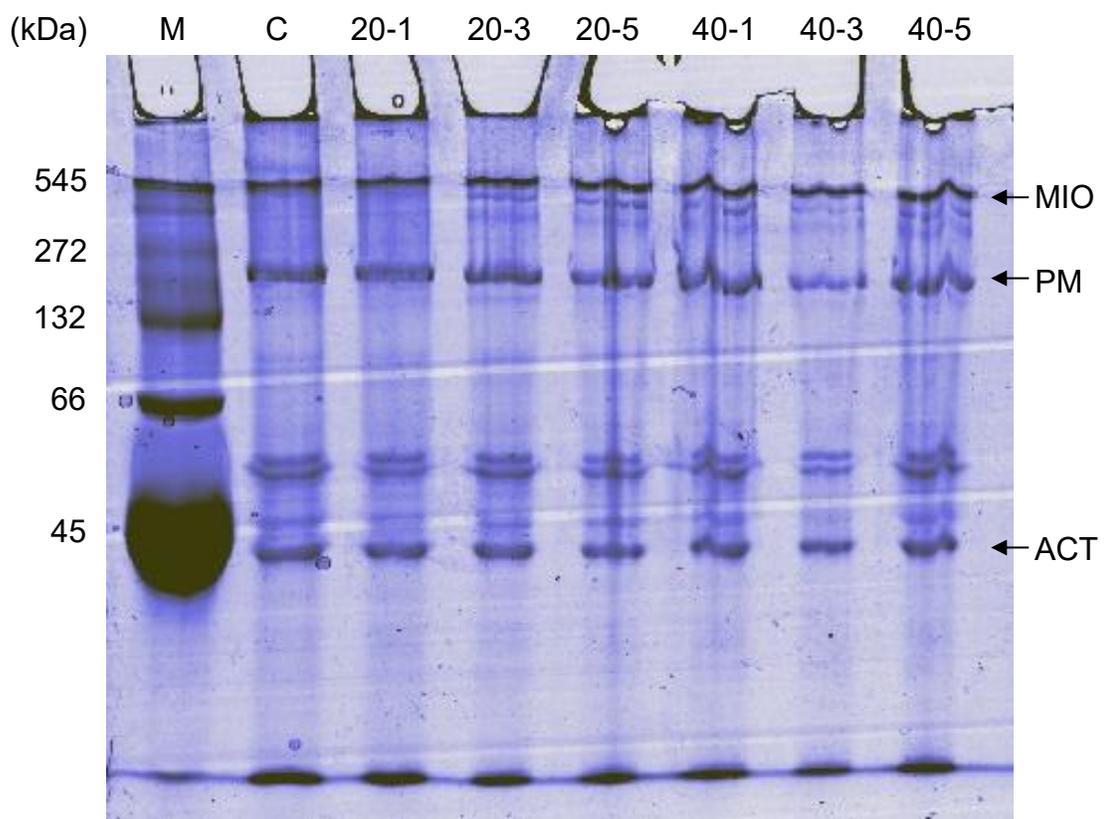


Figura 6. Efecto del ultrasonido en el perfil electroforético de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones nativas. Carril M, Marcador; C, Control; 20-1, 20%-1 min; 20-3, 20%-3 min; 20-5, 20%-5 min; 40-1, 40%-1 min; 40-3, 40%-3 min; 40-5, 40%-5 min.

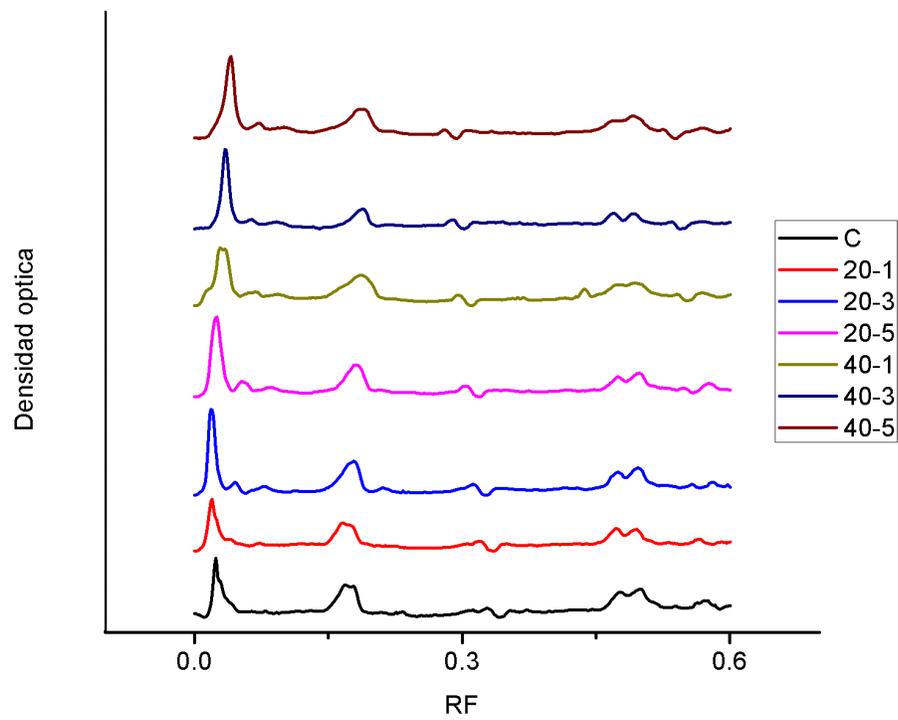


Figura 7. Densitograma de proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en condiciones nativas. Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

Hidrofobicidad de superficie (So)

La hidrofobicidad de superficie (So) de una solución proteica nos indica la exposición de grupos hidrofóbicos en la superficie de la molécula, que se encuentra en contacto con el ambiente polar acuoso. Debido a la estructura molecular de las proteínas, la hidrofobicidad de superficie tiene gran influencia en la estabilidad, conformación y propiedad funcional; por lo que una variación en este parámetro sugiere cambios conformacionales o un desplegamiento proteico (Chandrapala *et al*, 2011; Hu *et al*, 2013). En las Figuras 8 y 9 se puede observar que hay un aumento en la hidrofobicidad en todos los tratamientos, según incrementó tanto el tiempo como la amplitud aplicados, lo que indica que el ultrasonido tuvo un efecto ($p < 0.05$) sobre la estructura tridimensional de la proteína. La muestra control (sin pulsos) mostró una pendiente de 98.188 ($r^2 = 0.9938$), mientras que la muestra tratada con 20% y 3 min mostró el valor más alto 115.97 ($r^2 = 0.9999$), que corresponde a un incremento del 18.11% en hidrofobicidad. Sin embargo, la muestra 20-3 no mostró una diferencia significativa ($p > 0.05$) con los tratamientos 20-5, 40-1, 40-3 y 40-5. Lo anterior se le atribuye al efecto de cavitación que indujo un desplegamiento proteico y logró una mayor exposición de los residuos hidrofóbicos que se encuentran en el interior de las estructuras helicoidales de la cola de la miosina en todos los tratamientos. Esto coincide con lo previamente reportado por Higuera-Barraza *et al*. (2017), quienes aplicaron ultrasonido (20 kHz; 20 y 40%; 30, 60 y 90 s) a una solución proteica de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y observaron un incremento en la hidrofobicidad de superficie. En otro estudio, Hu *et al*. (2013) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 200, 400 y 600 W; 15 y 30 min) a una solución de proteína de soya, donde se observó un incremento al aumentar tanto el tiempo como la energía aplicada. Por otro lado, Chandrapala *et al*. (2011) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 1, 5, 10, 20, 30 y 60 min; 50%; 31 W) a una solución de proteína de lactosuero, donde la hidrofobicidad de superficie incrementó hasta los 5 min de sonicación, posiblemente por la desnaturalización parcial de la proteína, inducida por el ultrasonido. Sin embargo, la

hidrofobicidad disminuyó en tiempos mayores a 5 min, debido al incremento de interacciones proteína-proteína, que es un signo de agregación.

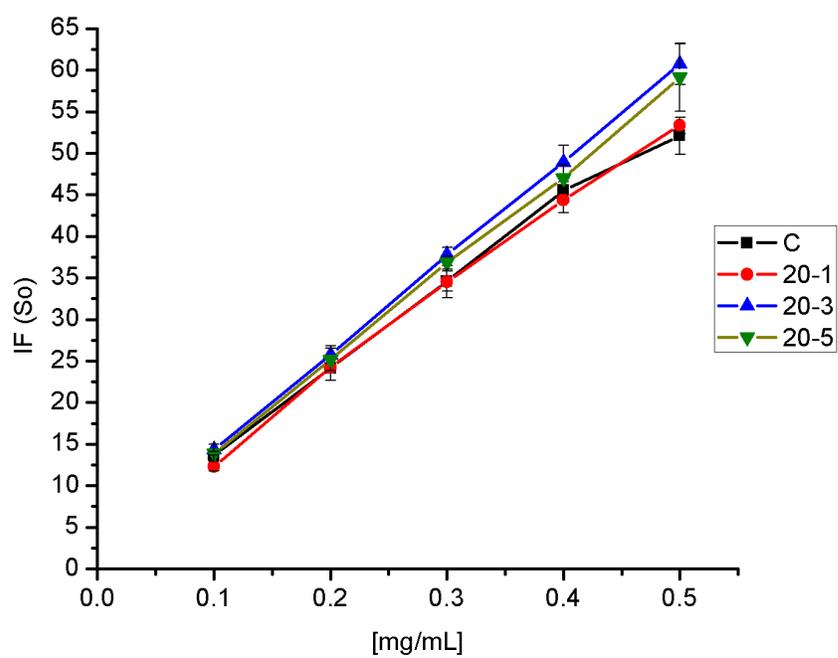


Figura 8. Efecto del ultrasonido al 20% sobre la hidrofobicidad de superficie (S_o) de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5.

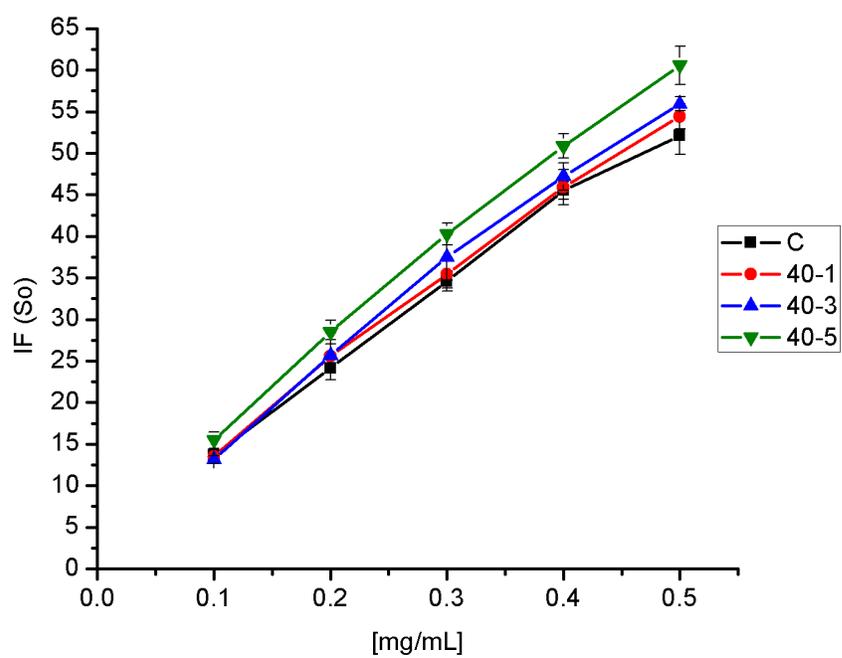


Figura 9. Efecto del ultrasonido al 40% sobre la hidrofobicidad de superficie (So) de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

Viscosidad de las soluciones proteicas

En la Figura 10 se muestra el efecto del ultrasonido sobre el comportamiento viscoso, donde se observó un comportamiento lineal (o Newtoniano) en el tratamiento control mientras que en el resto de los tratamientos uno pseudoplástico (o adelgazamiento por cizalla). La disminución de la viscosidad según el incremento de la tasa de corte se ocasiona por la ruptura de los enlaces químicos al aumentar y superar el movimiento browniano, las cadenas proteicas se alinean paralelas a la dirección del flujo causando menor resistencia a fluir, trayendo consigo una menor viscosidad. Un incremento en el esfuerzo de corte puede estar relacionado con el desplegamiento de la proteína, que permite una mayor exposición de residuos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, que podrían mejorar las interacciones proteína-agua (Figura 11). Esto se ve reflejado en un cambio en las características reológicas de las muestras. A partir de la gráfica del comportamiento de la viscosidad en función del tiempo a una velocidad de corte constante, fue posible ver una buena estabilidad, independientemente del tratamiento (Figura 12) y esto podría explicar la excelente EE de las proteínas de calamar gigante. Según los resultados, el aumento o la disminución de la viscosidad, así como su estabilidad a lo largo del tiempo, dependerán de las características inherentes del sistema de proteínas y de las condiciones de ultrasonido aplicadas.

Esto coincide con lo previamente reportado por Tan *et al.* (2015), quienes evaluaron el efecto del ultrasonido (20 kHz; 5, 15 y 25 min; 20, 40 y 60%) sobre una solución proteica de lactosuero (10, 15 y 20% p/v), encontrando una tendencia ascendente según el incremento del tiempo, amplitud y concentración de las muestras. Los autores le atribuyen este comportamiento al efecto cavitatorio que pudo haber interrumpido las interacciones electrostáticas de las proteínas, desplegándolas y volviéndolas menos compactas, trayendo como consecuencia un incremento en su volumen, que generó un aumento en la viscosidad. En un estudio relacionado con proteína muscular, Amiri *et al.* (2018) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 100 y 300 W; 10, 20 y 30 min) a una solución de proteína miofibrilar de tejido muscular de res

(*Longissimus dorsi*) (3% p/v), observando una disminución de la viscosidad debido al incremento del tiempo y energía del ultrasonido. Este comportamiento se relaciona con las fuerzas físicas producidas durante la cavitación, que generan el rompimiento de interacciones entre los filamentos de la proteína miofibrilar, y por consiguiente un reordenamiento de las moléculas a lo largo del campo de flujo, exhibiendo una menor resistencia a fluir. De manera similar, Wang *et al.* (2017) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 240 W; 0, 3, 6, 9, 12 y 15 min) a una solución de proteína miofibrilar de músculo de pollo (0.5% p/v), encontrando una disminución del esfuerzo de corte en la curva de flujo según fue incrementando el tiempo de aplicación del ultrasonido, que se atribuye a la interrupción de las interacciones hidrofóbicas internas de las muestras, previniendo la agregación de las proteínas por efecto de una mayor fuerza de corte y un movimiento molecular rápido producidos durante la cavitación.

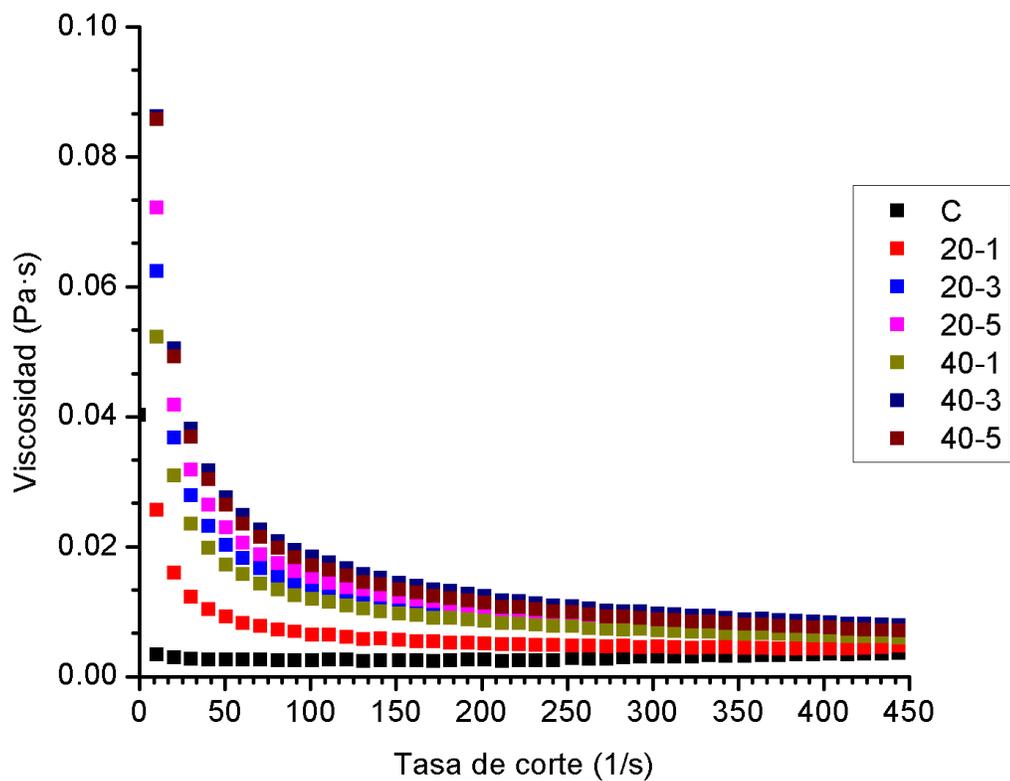


Figura 10. Efecto del ultrasonido sobre la curva de viscosidad de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

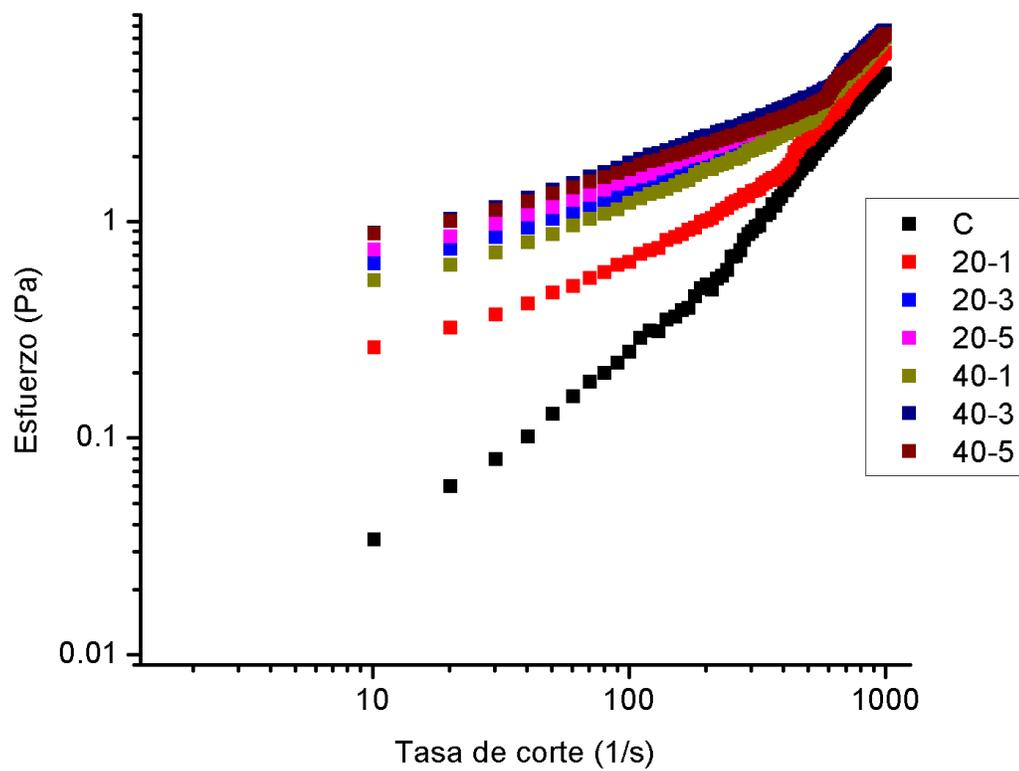


Figura 11. Efecto del ultrasonido sobre la curva de flujo de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

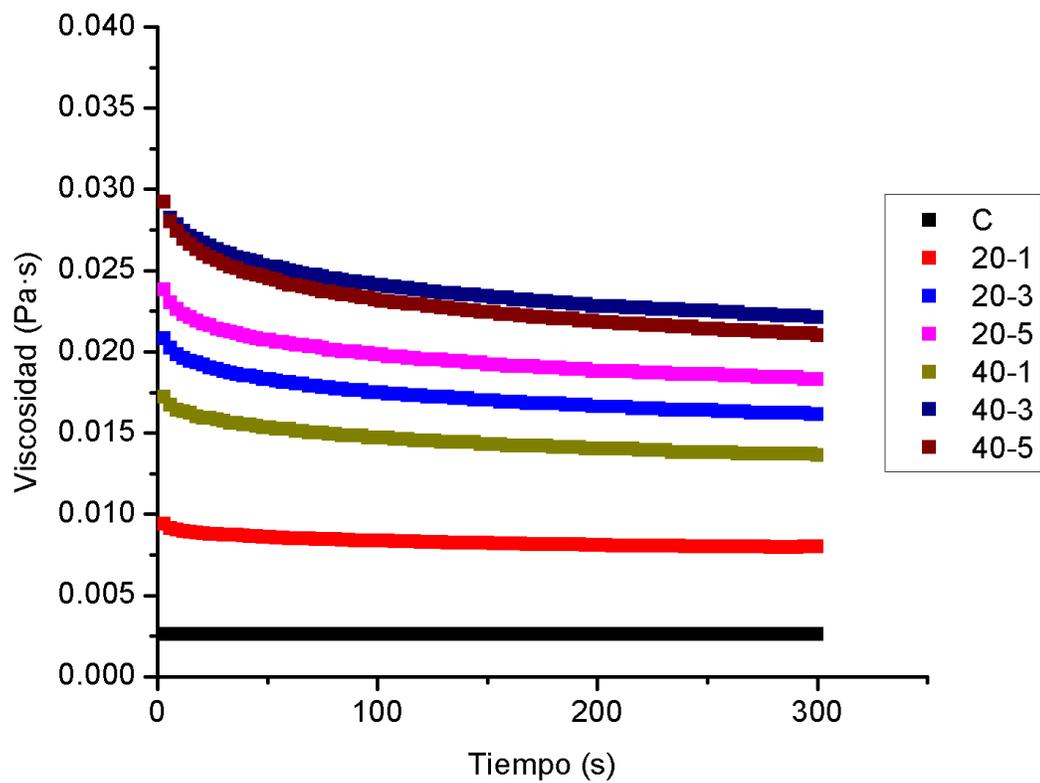


Figura 12. Efecto del ultrasonido sobre la viscosidad de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

Diámetro hidrodinámico (tamaño de partícula)

En la Figura 13 se muestra el efecto del ultrasonido sobre la distribución del tamaño de partícula de las proteínas, donde se observó que hay una reducción del tamaño para todos los tratamientos según incrementó tanto el tiempo como la amplitud del ultrasonido aplicados, mostrándose un mayor efecto en los tratamientos al 40%. Esto podría deberse a la cantidad de energía aplicada al sistema, al fenómeno de cavitación y a la turbulencia generada por éste, que conlleva al rompimiento de aglomerados a partículas más pequeñas, que podrían repercutir en cambios en la viscosidad.

En este sentido, Amiri *et al.* (2018) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 100 y 300 W; 10, 20 y 30 min) a una solución de proteína miofibrilar de tejido muscular de res (*Longissimus dorsi*) (3% p/v), y observaron un mayor efecto en la distribución de tamaño de partícula en los tratamientos con 300 W, con un decremento considerable en el tamaño de las partículas de proteína según fue mayor el tiempo de aplicación de ultrasonido. En otro estudio realizado por Xiong *et al.* (2016) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 0, 60 y 90%; 20 y 40 min) a una solución de ovalbúmina (5% p/v), y observaron un incremento en el tamaño de partícula y en el índice de polidispersión para todas las muestras, que se atribuye a las fuerzas turbulentas que pudieran incrementar la velocidad de colisión y agregación, formando agregados inestables por medio de interacciones hidrofóbicas. Malik *et al.* (2017) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 5, 10, 20 y 30 min; 25%; 500 W) a una solución de aislado proteico de harina de girasol (10% p/v), y observaron un decremento en el tamaño de partícula para todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con 30 min de aplicación, donde se observó un incremento de éste. Los autores sugieren que este comportamiento se podría atribuir a una aplicación prolongada de ultrasonido (mayor a 20 min), lo cual promueve la agregación de las partículas. Las distintas respuestas entre los tamaños de partícula se deben en gran medida a las características inherentes de cada tipo de proteína de estudio, que fue sometida al ultrasonido.

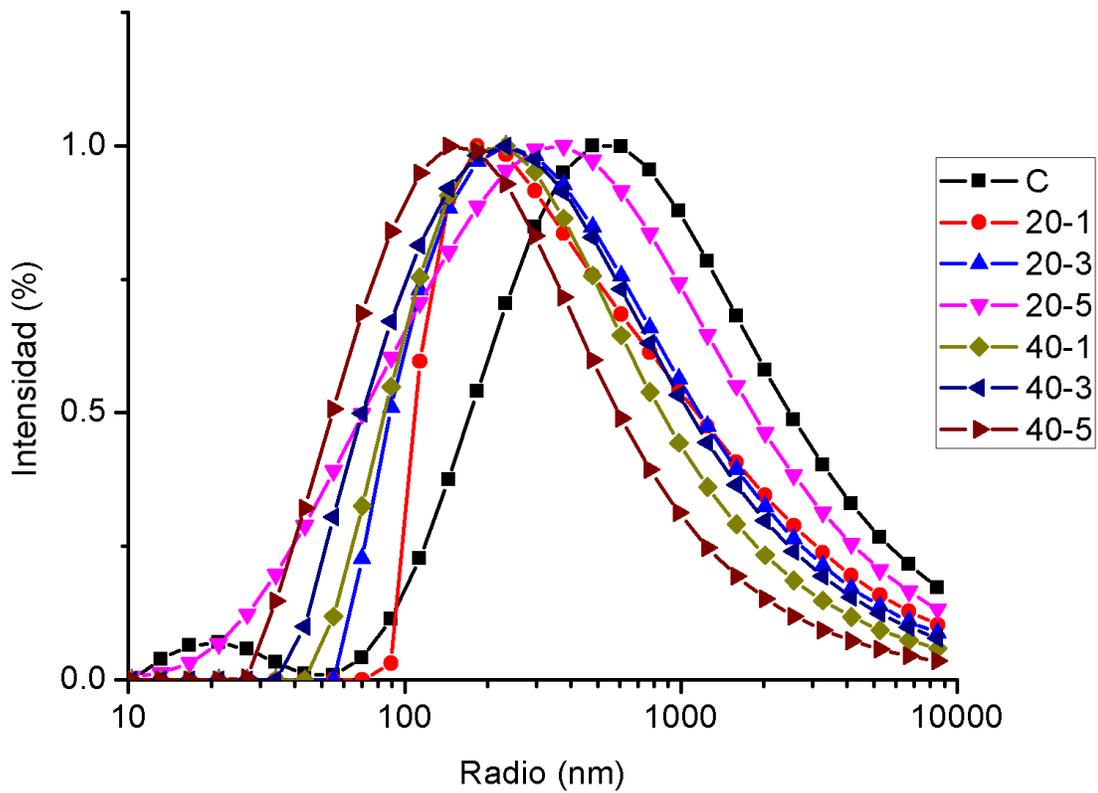


Figura 13. Efecto del ultrasonido sobre el tamaño de partícula de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

Potencial Zeta

El potencial zeta, o potencial electrocinético, nos brinda información sobre el potencial de una partícula coloidal en movimiento dentro del plano de deslizamiento, bajo un campo eléctrico. El potencial zeta refleja la diferencia de potencial entre la doble carga eléctrica de las partículas electroforéticamente móviles y la capa del dispersante alrededor de ellas en el plano de deslizamiento (Bhattacharjee, 2016). La mayoría de las proteínas poseen residuos hidrofóbicos no polares como los grupos aromáticos y alquilos, grupos iónicos como -NH_3^+ y -COO^- , así como también grupos polares hidrofílicos como -OH y -NH_2 , cuyo balance puede influenciar en la carga superficial final (Martínez-Velasco *et al.*, 2018).

En la Tabla 1 se muestra el efecto del ultrasonido sobre el potencial zeta de las soluciones proteicas. Las muestras presentaron carga neta negativa debido a una predominancia de aminoácidos ácidos como aspártico y glutámico, donde la muestra control mostró un potencial zeta de -25.67 ± 0.84 mV y el resto de los tratamientos con ultrasonido mostraron valores de -23.03 ± 1.19 a -16.10 ± 0.62 mV ($p < 0.05$). Estos valores se encuentran dentro del umbral de fina dispersión (-16 a -30 mV), según la escala Riddick (1968), que nos da información sobre la tendencia de las partículas de proteína hacia la aglomeración (estabilidad química) o de permanecer en suspensión (estabilidad física). Una disminución en la carga superficial se puede atribuir a la exposición de residuos apolares hidrofóbicos mediante el desplegamiento de la estructura secundaria de la proteína sometida al ultrasonido, con tendencia a un establecimiento y favorecimiento de interacciones proteína-proteína, que esto tiene congruencia con la determinación de hidrofobicidad de superficie y viscosidad. Xiong *et al.* (2016) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 0, 60 y 90%; 20 y 40 min) a una solución de ovalbúmina (5% p/v), observando un decremento en la carga neta superficial, debido a un desplegamiento parcial de la proteína y al incremento de la hidrofobicidad de superficie, trayendo consigo la disminución de la barrera electrostática. De manera similar, en otro estudio realizado por Xiong *et al.* (2018) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 0, 30, 60 y 90%; 30 min) a una solución de aislado

proteico de chícharo (5% p/v), donde el ultrasonido tuvo un efecto en la disminución de la carga superficial de las proteínas y en la barrera electrostática, contribuyendo en consecuencia con la propiedad espumante. Por otro lado, Jiang *et al.* (2014) aplicaron ultrasonido (20 kHz; 0, 150, 300 y 450 W; 12 y 24 min) a una solución de aislado proteico de frijol negro (10% p/v), donde se observó un incremento en el potencial zeta a 150 y 300 W, y una disminución al aplicar 450 W. Los autores atribuyen este comportamiento a que la ultrasonicación a baja y mediana potencia podrían incrementar la carga superficial negativa de las proteínas mediante el reforzamiento de las repulsiones electrostáticas entre las partículas, disrumpiendo los agregados proteicos e inhibiendo la agregación adicional, que conlleva a una mejora en la estabilidad de las dispersiones proteicas. En el caso de las muestras donde disminuyó el potencial zeta, se le atribuye a la formación de agregados cuando las muestras fueron sometidas a la ultrasonicación de alta potencia.

Tabla 1. Efecto del ultrasonido sobre el potencial zeta de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Muestra	Potencial zeta (mV)
C	-25.67 ^a ± 0.84
20-1	-23.03 ^b ± 1.19
20-3	-18.33 ^c ± 0.32
20-5	-18.27 ^c ± 0.75
40-1	-19.43 ^c ± 0.70
40-3	-16.10 ^d ± 0.62
40-5	-19.87 ^c ± 0.83

Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5. ^{ab}Medias con diferente literal indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores son promedio de tres réplicas ± DE.

Preparación de la Espuma

Capacidad Espumante (CE)

El efecto de la aplicación de ultrasonido sobre la capacidad espumante (CE) se muestra en la Figura 13. Como puede apreciarse, la CE se vio afectada por la cantidad de energía que se aplicó durante la ultrasonificación, observándose un aumento respecto al control. Se presentó mayor CE en los tratamientos al 40% de amplitud, siendo 1 min de aplicación el necesario para lograrlo ($p < 0.05$); mientras que al utilizar 20% de amplitud, se requirieron 3 min para lograr el mayor efecto ($p < 0.05$). El aumento en la CE puede atribuirse al posible desplegamiento proteico causado por la aplicación del ultrasonido, lo cual conlleva a una mayor exposición de regiones hidrofóbicas hacia la superficie, incrementando las interacciones aire-agua. Estos resultados concuerdan con los de hidrofobicidad de superficie y con la electroforesis nativa.

De manera similar, Singh *et al.* (2017) evaluaron el efecto del ultrasonido (20 kHz; 30, 40, 50, 60 y 70%; 10, 15, 20, 25 y 30 min) sobre la propiedad espumante de proteína de ovario de calamar (*Loligo formosana*) a una concentración del 4 % (p/v). Estos investigadores reportaron un incremento en esta propiedad por efecto del ultrasonido, siendo el mayor tiempo de aplicación de ultrasonido donde se obtuvo mayor capacidad espumante. Los autores atribuyeron lo anterior a la desnaturalización parcial de la proteína, afectando su solubilidad e induciendo la formación de agregados a un tiempo mayor de batido, lo que ocasionó que el sistema de fases colapsara.

Con esto, se sugiere que la aplicación de los pulsos ultrasónicos favoreció la capacidad espumante de las proteínas del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

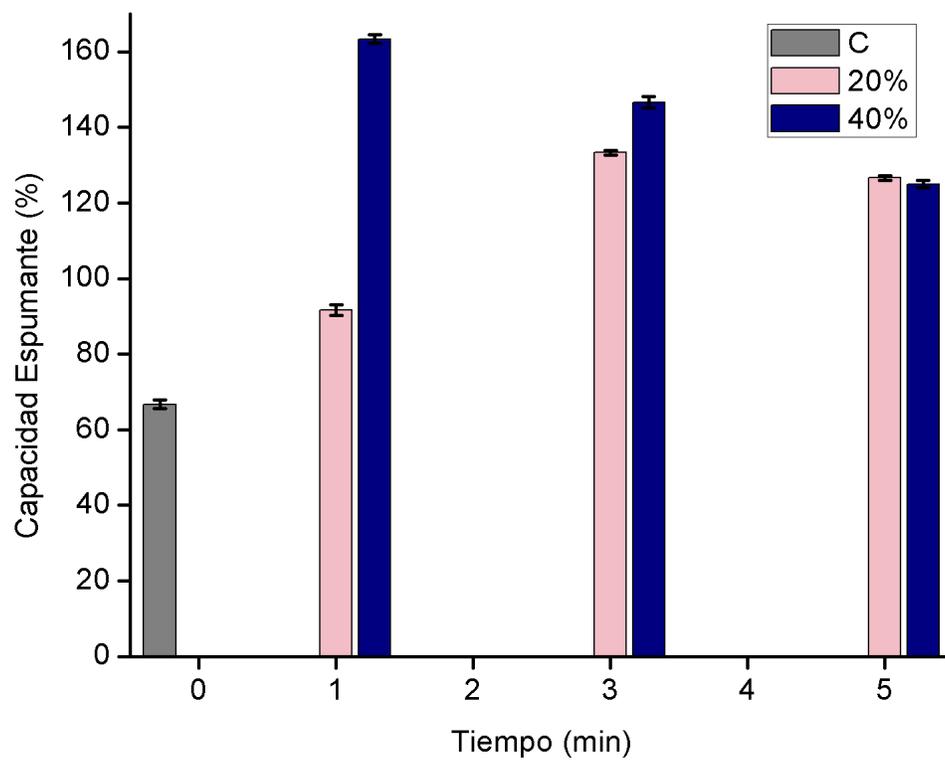


Figura 14. Efecto del ultrasonido sobre la capacidad espumante (CE) de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones.

Estabilidad Espumante (EE)

En relación con la estabilidad espumante (EE), en las Figuras 14 y 15 se muestra el efecto del ultrasonido sobre esta propiedad a 20 y 40% de amplitud, respectivamente. Se observa que las espumas desarrolladas para todos los tratamientos tienden a permanecer estables, aun después de 6 h de su preparación, incluso la espuma desarrollada a partir de la muestra control. El tratamiento que logró la mayor EE fue el 40-5 ($p>0.05$) respecto al control. Lo anterior se puede deber a que el desplegamiento de la proteína, inducido por el ultrasonido, no sólo expone regiones hidrofóbicas, sino también hidrofílicas. Este cambio conformacional permite una mayor adsorción de las proteínas en la interfaz aire-agua debido a una mayor exposición de grupos con carga ($-\text{NH}_4^+$, $-\text{COO}^-$) que incrementan y favorecen las interacciones electrostáticas, lo cual permite la formación y estabilidad de la espuma.

El estudio de esta propiedad en fuentes proteicas de origen marino se encuentra escasamente reportado, teniendo más información en proteínas de animales terrestres. En este sentido, Stefanović et al. (2017) observaron un comportamiento similar al evaluar la EE de una solución proteica de clara de huevo tratada con ultrasonido (20 kHz; 40%; 2, 5, 10, 15 y 20 min). Estos investigadores encontraron un incremento en la propiedad funcional espumante tanto en CE como en EE, siendo el tratamiento a los 15 min el más favorable. Cabe mencionar que los autores realizaron esta determinación hasta los 30 min, difiriendo del presente estudio, que se midió el volumen de espuma remanente de los tratamientos cada hora durante 6 h. Lo anterior resulta favorable para la presente investigación debido a que nos brinda más información sobre la estabilidad de los distintos sistemas proteicos.

Es importante resaltar que la EE del tratamiento control es prácticamente estable ($p>0.05$) después de 6 h, mientras que, al utilizar 20% de amplitud, 20-1 y 20-3 presentan una disminución significativa ($p<0.05$), y sólo 20-5 fue estable después de 6 h ($p>0.05$). Un resultado similar se aprecia al utilizar 40% de amplitud, donde 40-1 disminuye significativamente a partir de las 4 h ($p<0.05$), mientras que 40-3 y 40-5 tienen buena EE después de 6 h ($p>0.05$), pero no mejor que el control en el caso del

tratamiento 40-3. Lo anterior podría relacionarse con el volumen de espuma generado y con el tamaño de burbuja, donde se encontró que, los tratamientos con menor CE mostraron la mayor EE. Estos datos presentan congruencia, pues regularmente conforme más pequeña es la burbuja, mayor suele ser su estabilidad.

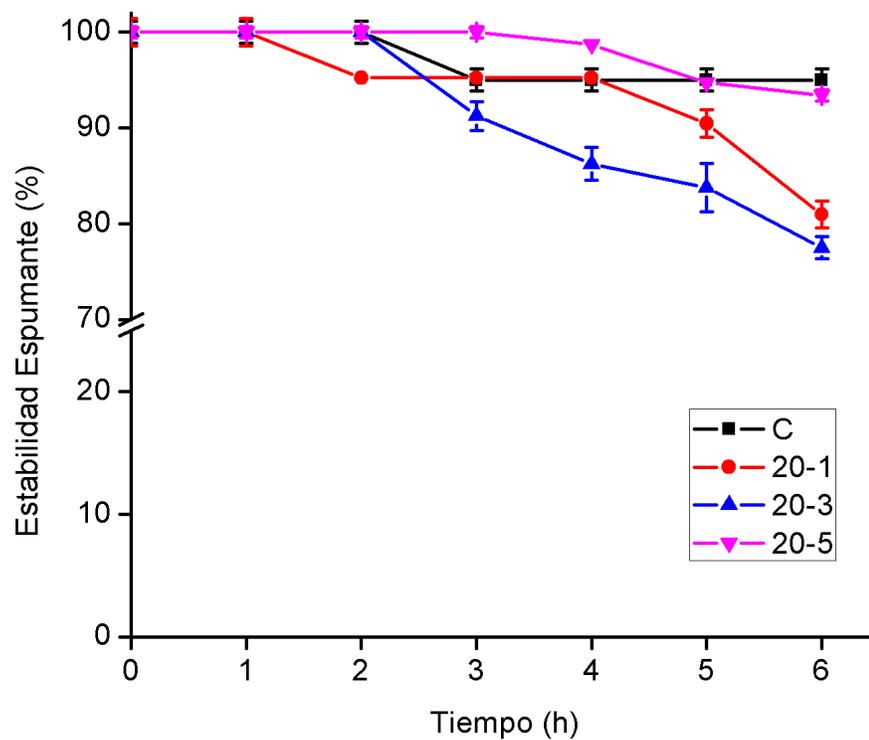


Figura 15. Efecto del ultrasonido al 20% sobre la estabilidad espumante (EE) de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones. Control, C; 20%-1 min, 20-1; 20%-3 min, 20-3; 20%-5 min, 20-5.

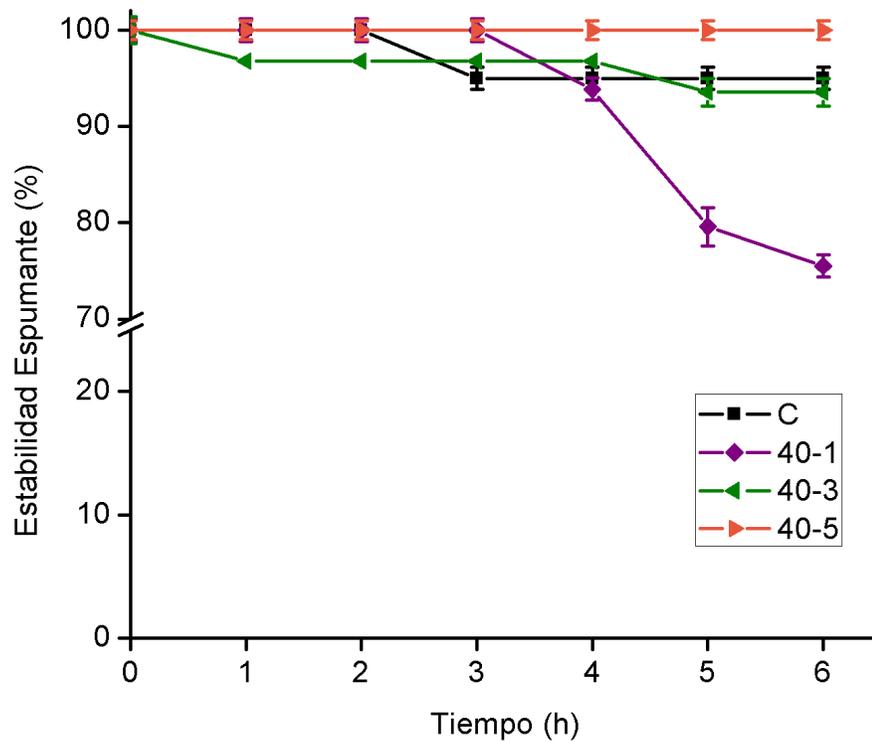


Figura 16. Efecto del ultrasonido al 40% sobre la estabilidad espumante (EE) de las proteínas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Los datos son la media \pm la desviación estándar de tres repeticiones. Control, C; 40%-1 min, 40-1; 40%-3 min, 40-3; 40%-5 min, 40-5.

CONCLUSIONES

La aplicación de ultrasonido a 20 kHz con 20 y 40% de amplitud muestra un efecto positivo sobre la propiedad espumante de la proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en solución. Esto se debe al efecto de cavitación que induce un cambio en la estructura tridimensional de la proteína y la disminución del tamaño de partícula, viéndose incrementada la exposición de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos hacia la superficie, y disminuida la carga neta superficial, siendo los tratamientos al 40% de amplitud donde se observa mayor efecto. Lo anterior repercute en las características reológicas de la proteína, viéndose incrementada la viscosidad, que conlleva a un favorecimiento e incremento en la formación de espuma, aun cuando la estabilidad espumante no es mejor que en la muestra control sí se logra un aumento significativo en la capacidad espumante. Por lo anterior, la aplicación de este tratamiento representa una alternativa para mejorar la funcionalidad de las proteínas obtenidas del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) para la formación de espuma.

RECOMENDACIONES

Se recomienda la incorporación de las muestras proteicas tratadas con ultrasonido a un modelo alimenticio y su posterior caracterización y análisis sensorial.

Se recomienda realizar determinaciones complementarias para obtener más información sobre los cambios estructurales de la proteína en solución por efecto del ultrasonido, como dicroísmo circular, FT-IR y calorimetría diferencial de barrido.

BIBLIOGRAFÍA

- Amiri, A., Sharifian, P., & Soltanizadeh, N. (2018). Application of ultrasound treatment for improving the physicochemical, functional and rheological properties of myofibrillar proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.167>
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 25, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.08.012>
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. (M. B. Gutiérrez, Ed.) (Cuarta edi).
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 18(5), 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.12.016>
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Encinas-Arzate, J. D. J., Ezquerro-Brauer, J. M., Ocaño-Higuera, V. M., Armenta-Villegas, L., Torres-Arreola, W., & Marquez-Rios, E. (2014). Effect of Ionic Strength on Soluble Protein Removal from Giant Squid Mantle (*Dosidicus gigas*) and Functional Evaluation of Protein Recovery. *Food Sci. Biotechnol*, 23(2), 401–407. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0055-y>
- FAO. (2016). El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura.
- Fennema, O. R. (2008). *Química de los Alimentos* (Cuarta edi).
- Foegeding, E. A., & Davis, J. P. (2011). Food Protein Functionality: A Comprehensive Approach. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1853–1864. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.008>
- Fuente-Betancourt, G. D. La, García-Carreño, F., Toro, M. de los Á. N. del, Pacheco-Aguilar, R., & Córdova-Murueta, J. H. (2008). Original article Effect of storage at 0 ° C on mantle proteins and functional properties of jumbo squid. *Food Science and Technology*, 1263–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01602.x>
- Higuera-Barraza, O. A., Toro-Sánchez, C. L. Del, Ruiz-Cruz, S., & Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of High-Energy Ultrasound on the Functional Properties of Proteins. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 31, 558–562. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.02.007>
- Higuera-Barraza, O. A., Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer, J. M., Cinco-Moroyoqui, F. J., Figueroa, J. C. R., & Marquez-Ríos, E. (2017). Effect of Pulsed Ultrasound on the Physicochemical Characteristics and Emulsifying properties of Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle Proteins. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 38, 829–834.

- <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.008>
- Hu, H., Wu, J., Li-chan, E. C. Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., ... Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.001>
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.012>
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., ... Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022>
- Lehninger, A. L. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica* (Quinta edi).
- Li, K., Kang, Z. L., Zhao, Y. Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2014). Use of High-Intensity Ultrasound to Improve Functional Properties of Batter Suspensions Prepared from PSE-like Chicken Breast Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3466–3477. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1358-y>
- Lopez-Enriquez, R. L., Ocano-Higuera, V. M., Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer, J. M., & Marquez-Rios, E. (2015). Chemical and Functional Characterization of Sarcoplasmic Proteins from Giant Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle. *Journal of Chemistry*, 2015. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2015/538721>
- Lv, T., Wang, Y., Pan, D., Cao, J., Zhang, X., Sun, Y., ... Liu, Y. (2017). Effect of trypsin treatments on the structure and binding capacity of volatile compounds of myosin. *Food Chemistry*, 214, 710–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.115>
- Malik, M. A., Sharma, H. K., & Saini, C. S. (2017). High Intensity Ultrasound Treatment of Protein Isolate Extracted from Dephenolized Sunflower Meal: Effect on Physicochemical and Functional Properties. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 39(May), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.05.026>
- Márquez-Álvarez, L. R., Ocaño-Higuera, V. M., Rodríguez-Félix, F., Ruiz-Cruz, S., Toro-Sánchez, C. L. Del, & Márquez-Ríos, E. (2015). Production and Functional Evaluation of a Protein Concentrate from Gigant Squid (*Dosidicus gigas*) Fins Obtained by Alkaline Dissolution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(April), 2215–2224. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12466>
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44(January), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>
- Mereghetti, M. (2017). Peru to Launch World's Largest Giant Squid Certification Project. Retrieved from <https://www.undercurrentnews.com/2017/04/07/peru-to-launch-worlds-largest-giant-squid-certification-project/>
- Mirmoghtadaie, L., Aliabadi, S. S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent Approaches in

- Physical Modification of Protein Functionality. *Food Chemistry*, 199, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.067>
- Moral, A., Morales, J., Ruíz-Capillas, C., & Montero, P. (2002). Muscle Protein Solubility of Some Cephalopods (Pota and Octopus) During Frozen Storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 668(December 2001), 663–668. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1088>
- Morales-Bojórquez, E., Cisneros-Mata, M. A., Nevárez-Martínez, M. O., & Hernández-Herrera, A. (2001). Review of Stock Assessment and Fishery Biology of *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research*, 54, 83–94. [https://doi.org/DOI: 10.1016/S0165-7836\(01\)00372-1](https://doi.org/DOI: 10.1016/S0165-7836(01)00372-1)
- Morales, R., Martínez, K. D., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., & Pílosof, A. M. R. (2015). Modification of Foaming Properties of Soy Protein Isolate by High Ultrasound Intensity: Particle Size Effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.01.011>
- Murrieta-Martínez, C. L., Ocaño-Higuera, V. M., Suárez-Jiménez, G. M., & Márquez-Ríos, E. (2016). Squid Protein Characteristics and their Potential Industrial Applications. *Interciencia*, 520–525. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33946993002>
- O'Sullivan, J. J., Park, M., Beevers, J., Greenwood, R. W., & Norton, I. T. (2017). Applications of Ultrasound for the Functional Modification of Proteins and Nanoemulsion Formation: A Review. *Food Hydrocolloids*, 71, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.037>
- Riddick, T. M. (1968). *Control of Colloid Stability through Zeta Potential*. Livingston, Wynnewood, PA.
- SAGARPA-CONAPESCA. (2017). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.
- Singh, A., Benjakul, S., & Kijroongrojana, K. (2017). Effect of Ultrasonication on Physicochemical and Foaming Properties of Squid Ovary Powder. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.005>
- Stefanović, A. B., Jovanović, J. R., Dojčinović, M. B., Lević, S. M., Nedović, V. A., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Effect of the Controlled High-Intensity Ultrasound on Improving Functionality and Structural Changes of Egg White Proteins. *Food Bioprocess Technol*, 1224–1239. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1884-5>
- Tan, M. C., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Taip, F. S., & Abdullah, J. (2015). Characterisation of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension. *International Dairy Journal*, 43, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.013>
- Tolano-Villaverde, I. J., Ocaño-Higuera, V., Ezquerro-Brauer, J., Santos-Sauceda, I., Santacruz-Ortega, H., Cárdenas-López, J. L., ... Márquez-Ríos, E. (2017). Physicochemical characterization of actomyosin-paramyosin from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (May). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8653>
- Valencia-Pérez, A. Z., García-Morales, M. H., Cárdenas-López, J. L., Herrera-Urbina, J. R., Rouzaud-Sáñez, O., & Ezquerro-Brauer, J. M. (2008). Effect of Thermal

- Process on Connective Tissue from Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) Mantle. *Food Chemistry*, 107, 1371–1378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.060>
- Wang, J. yu, Yang, Y. ling, Tang, X. zhi, Ni, W. xi, & Zhou, L. (2017). Effects of pulsed ultrasound on rheological and structural properties of chicken myofibrillar protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.018>
- Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., & Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*, 109(April), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.044>
- Xiong, W., Wang, Y., Zhang, C., Wan, J., Shah, B. R., Pei, Y., ... Li, B. (2016). High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 31, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.014>
- Xue, S., Xu, X., Shan, H., Wang, H., Yang, J., & Zhou, G. (2018). Effects of high-intensity ultrasound, high-pressure processing, and highpressure homogenization on the physicochemical and functional properties of myofibrillar proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45(December 2017), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.007>