

UNA REVISIÓN DE LAS ENZIMAS DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*) CON ÉNFASIS EN LAS HIDROLASAS

A REVIEW OF JUMBO SQUID (*Dosidicus gigas*) ENZYMES WITH EMPHASIS IN
HYDROLASES

América Guadalupe Moreno Martínez¹, Rosalina Ramírez Olivas¹, Josafat Marina Ezquerro Brauer², Victor Manuel Ocaño Higuera¹ y José Luis Cárdenas López^{2*}

¹Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Son.

²Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n Col. Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Son.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un recurso pesquero de gran importancia en nuestro país. El volumen de captura de esta especie ha sido del orden de las 100000 ton en algunos años recientes y se obtiene principalmente en los estados de Baja California Sur, Sonora y Sinaloa (CONAPES-CA, 2010). La importancia económica del calamar gigante está ligada a los volúmenes de captura, ya que al ser un producto muy barato y sobre todo subutilizado, es necesario obtener grandes volúmenes de esta especie para que pueda reflejar una ganancia económica.

En México, podemos ubicar este recurso en la parte central del Golfo de California, observándose migraciones de los meses de noviembre y diciembre, de Santa Rosalía a Guaymas y emprendiendo el viaje de regreso en los meses de mayo y junio.

Es una especie que presenta ciclos de vida cortos, sin superar los dos años de vida las especies más longevas. Son depredadores muy activos, carnívoros e incluso caníbales, ya que requieren de altas ingestas de alimentos para cubrir los requerimientos calóricos necesarios para sostener su alta tasa metabólica.

El calamar gigante, está constituido por dos regiones, la cabeza, la cual tiene 8 brazos y 2 tentáculos alrededor de la boca que esta constituida por un pico quitinoso y una rádula. Sus ojos son los más desarrollados de los invertebrados y se sitúan a ambos lados de la cabeza. El manto alberga los órganos internos y es de forma cilíndrica, en su extremo terminal cuenta con 2 aletas romboidales que forman parte de su sistema de locomoción junto con el sifón. El primero sirve para el nado lento y el segundo para el nado rápido mediante la propulsión a chorro (Ehrhardt *et al.*, 1983).

La región del animal que principalmente se aprovecha y comercializa es el manto, del cual solamente un porcentaje muy bajo se distribuye a nivel nacional, ya que en México no se tiene una cultura de consumo del calamar, aunque en años recientes se ha estado utilizando como sustituto del pulpo y de abulón. El resto de la captura del calamar se exporta a otros mercados, principalmente el asiático (Luna-Raya *et al.*, 2006). Sin embargo, éste es exportado como materia prima y no como producto terminado.

Las partes del calamar que no son utilizadas (entre el 40-60 % del animal), tales como los tentáculos, cabeza y las vísceras, en estas últimas se incluye a la glándula digestiva o hepatopáncreas, un

tejido rico en enzimas proteolíticas, se convierten en desperdicios, contribuyendo así a la contaminación del ambiente (Klomklao, 2008). Es necesario encontrar otras alternativas de uso para el calamar gigante. Una opción es la obtención de enzimas, sobre todo del hepatopáncreas ya que como se ha mencionado, tiene una intensa actividad enzimática, especialmente de proteasas. Este tipo de industria de extracción de enzimas de productos del mar ha tenido éxito en países como Noruega y Suecia.

LAS ENZIMAS DE CALAMAR GIGANTE

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica debido a su poder específico de activación, intervienen en todos los procesos metabólicos, que no podrían llevarse cabo sin su presencia. Al ser proteínas, se ven afectadas por las mismas condiciones que una proteína común, como son los cambios de pH, temperatura, concentración, fuerza iónica, etc. (Whitaker, 1994).

Para su estudio podemos tomar en cuenta tres aspectos:

Su función biológica, es decir, de qué manera la enzima interviene en el correcto funcionamiento del organismo. Esto también ayuda a comprender como es afectado un organismo por los cambios en su entorno que pueden derivar en alteraciones metabólicas o cambios evolutivos.

Su capacidad de conferir o quitar un atributo de calidad. Si lo vemos desde el punto de vista de tecnología de los alimentos, hay enzimas capaces de generar cambios endógenos en el organismo y que se reflejan en sus productos alimenticios. Por citar un ejemplo, está la intervención de las enzimas en la maduración de la carne como cambio deseable. Un cambio indeseable sería la pérdida de la firmeza en el músculo de calamar por acción enzimática.

El tercer aspecto se refiere a la obtención de enzimas de un organismo para aplicarlas en otras áreas de la industria, como el uso de ciertas enzimas de origen marino en la fabricación de queso, o en la industria de las pieles o los detergentes (Shahidi y Janak Kamil, 2001).

Si tomamos en cuenta estos puntos podemos ver que la importancia del estudio de las enzimas va más allá que la mera aplicación de un proceso tecnológico. Es clave en la optimización de procesos industriales, de conservación de alimentos, de control de enfermedades e incluso del equilibrio ecológico.

En el caso del calamar gigante, cuya importancia económica es relevante, pero su industria aun se encuentra en proceso de desarrollo, la tecnología enzimática puede hacer que la especie pase de ser un producto subutilizado a un producto con alto porcentaje de aprovechamiento integral. En el caso de la obtención de enzimas para aplicación industrial, éstas pueden ser obtenidas de aquellas partes del calamar que no son aprovechadas de forma eficiente, por ejemplo las vísceras, que contienen enzimas muy activas, acostumbradas a adaptarse a cambios en la cantidad de oxígeno o a cambios de temperatura y a procesos metabólicos más rápidos que los realizados por sus homólogos terrestres, como en el caso del crecimiento o la digestión (Haard, 1994) Asimismo, los beneficios del conocimiento de las enzimas encontradas en el calamar gigante pueden ir desde un mayor conocimiento de los aspectos fisiológicos de la especie y cómo ésta es afectada por los cambios en su entorno, hasta su manejo poscaptura o la completa utilización de las partes que constituyen el cuerpo del calamar.

Sin embargo, al hablar de enzimas de calamar gigante cabe preguntarnos ¿Dónde se encuentra ésta información? A nivel mundial, varios investigadores han generado información sobre

las enzimas encontradas en el calamar gigante, pero esta información se mantiene dispersa en las diferentes revistas científicas especializadas. Existen varios grupos de investigación sobre enzimas de calamar gigante, los estudios que se han realizado van desde la detección de actividad enzimática general en el músculo del calamar, hasta el aislamiento y caracterización de enzimas específicas en diversos órganos de esta especie. Las enzimas se encuentran clasificadas en 6 grupos (oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas) y esta misma clasificación nos servirá para enumerar las enzimas encontradas en calamar gigante, por lo que a continuación se muestra un resumen de lo publicado hasta la fecha.

Óxido-reductasas

La enzima lisil oxidasa fue purificada parcialmente por Torres-Arreola *et al.* (2011) de los tentáculos del calamar gigante. Es una enzima que aunque ya había sido ampliamente estudiada en organismos terrestres, en organismos marinos su presencia y características cinéticas habían sido reportadas de manera muy somera.

Este estudio, logró sentar las bases para el protocolo de purificación de esta enzima en organismos marinos. La importancia del estudio de esta enzima radica en que es la responsable de catalizar los primeros pasos del entrecruzamiento de las fibras de colágeno en el músculo, influyendo directamente en sus características de firmeza. Esto es muy importante ya que la firmeza es uno de los principales atributos de calidad en el músculo de calamar.

Transferasas e Hidrolasas

Mientras que en el grupo correspondiente a las transferasas no se han encontrado reportes publicados de actividad enzimática, el grupo correspondiente a las hidrolasas, cuenta con la mayor concentración de información generada sobre enzimas de calamar gigante. Dentro de las hidrolasas, las proteasas son el grupo de enzimas más estu-

diado para procesos bioindustriales. Casi la mitad de todas las enzimas industriales son proteasas, utilizadas en industrias como la de detergentes, peletería e industria alimentaria (Klomklao, 2008).

Las proteasas podemos dividir las para su estudio en 2 grupos: exoproteasas (también llamadas peptidasas), cuando la enzima rompe un extremo de la cadena proteica o bien, endoproteasas (proteinasas), si éstas rompen la cadena de forma interna.

En el calamar gigante se han realizado diversos estudios sobre actividad proteolítica. En un principio, estos estudios no buscaban determinar la actividad de una enzima en específico, pero sirvieron para conocer algunas de las características de las enzimas presentes y su efecto en los tejidos estudiados, lo que ha permitido con el paso del tiempo una especialización en el estudio de las enzimas del calamar gigante y la generación de hipótesis sobre qué tipo de enzimas falta por descubrir en esta especie.

De los estudios sobre actividad proteolítica general en calamar gigante resaltan los siguientes: Ramirez-Olivas (2000) detectó en el extracto crudo de manto de calamar gigante actividad proteolítica; dándole seguimiento durante el almacenamiento en hielo. Encontró que el músculo de calamar presentaba actividad tipo tripsina y quimotripsina, así como actividad tipo leucina aminopeptidasa, prolina aminopeptidasa y lisina aminopeptidasas. Asimismo, se midieron los cambios de textura en el músculo de calamar gigante durante 15 días de almacenamiento en hielo y se llegó a la conclusión de que las enzimas presentes en el músculo de calamar afectaban su textura (Ramirez-Olivas *et al.*, 2004).

Ezquerria-Brauer *et al.* (2002) realizaron un estudio en el cual se determinó la influencia de la temporada de captura sobre la actividad proteolítica de los tejidos de hepatopáncreas y manto de

calamar gigante. Encontrando que la temporada de captura afectaba no solo las características físicas de esta especie, sino que también su actividad proteolítica.

Se encontró que los ejemplares capturados durante el otoño medían casi el doble que los capturados en verano. Respecto a la composición química del manto y del hepatopáncreas, esta varió significativamente con la estación, reportándose menos humedad y más proteína cruda y ceniza en los mantos de los calamares obtenidos en primavera. En el hepatopáncreas, estas determinaciones no tuvieron una variación estadísticamente significativa.

Para determinar la actividad enzimática en manto y hepatopáncreas de calamar gigante, se obtuvieron extractos enzimáticos de estos tejidos, llamados extracto enzimático de músculo (EM) y extracto enzimático de hepatopáncreas (EHP). Estos extractos fueron sometidos a un ensayo enzimático con azocaseína y se encontró que el extracto de hepatopáncreas presentaba una considerable actividad de endoproteinasas. Los EHP de calamar gigante contenían también actividades detectables de tripsina, quimotripsina, alanina aminopeptidasa y alanina-fenilalanina carboxipeptidasa. Estas actividades también fueron encontradas en el extracto enzimático de manto, pero en mucha menor proporción. Los EM de los calamares que se cosecharon en otoño, presentaron una actividad de proteasas más alta.

Los factores ambientales y biológicos, como la maduración, desove, alimentación y temperaturas del hábitat afectan las enzimas de los productos del mar. Sin embargo, no fue posible establecer cual factor provocó la variación en la actividad proteolítica total en este estudio.

El pH en la actividad proteolítica total en el EHP en la temporada de primavera presentó un pH óptimo de 5-6 y una temperatura óptima de 70

°C, estos resultados variaron con respecto a los encontrados en el EHP de otoño, donde se obtuvieron valores de pH óptimo de 5 y 9, así como temperaturas óptimas de 40 °C y 70 °C.

En el EM, la temporada de pesca afectó a los valores de pH y temperatura, presentándose dos picos de actividad a pH 6 y 8 para primavera y de 6 y 10 para otoño. Esto sugiere que las proteasas ácidas y alcalinas siempre están presentes en el manto de calamar, pero en distinta proporción según la temporada. La temperatura óptima para el EM en primavera fue de 60 °C y en otoño fue de 40 °C.

La composición y peso molecular de las enzimas en EHP fue determinada mediante zimogramas o geles de electroforesis de actividad enzimática. En el zimograma del EHP de calamar de primavera había una zona de gran actividad, que mostraba actividad caseinolítica. La masa molecular de dicha zona era de 33 kDa. En los EHP de otoño las masas moleculares de las zonas activas estuvieron entre 26 y 36 kDa.

En los EM los zimogramas fueron detectables. Pero las bandas de los patrones de proteína para los EM de calamar de abril y noviembre fueron similares. 15 bandas fueron separadas por SDS-PAGE con masas moleculares entre 20-66 kDa.

En conclusión, este estudio demostró que la actividad proteolítica tanto en el EHP, como en EM, se ve afectada por la temporada de captura.

Konno *et al.* (2003) realizaron la desnaturalización térmica y el perfil de autólisis de las proteínas miofibrilares del músculo del manto de calamar gigante para determinar la viabilidad del uso de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) como sustituto del calamar japonés (*Todarodes pacificus*). Investigaron las propiedades bioquímicas de las miofibrillas del calamar gigante mediante la medición de tres tipos de actividades de ATPasa por cambios de concentración de KCl, el perfil de inactivación

térmica de la Ca^{2+} ATPasa miofibrilar y el perfil de autólisis por el control de la división de la miosina en la incubación de un homogenado muscular de calamar gigante.

Se encontró una importante actividad hidrolítica de la miosina por la acción de metaloproteasas a pH fisiológicos y estas enzimas fueron parcialmente inhibidas en procesos tecnológicos por adición de EDTA. El resultado de esta investigación fue que las propiedades bioquímicas y el perfil de inactivación térmica de la Ca^{2+} ATPasa así como el perfil de autólisis del músculo del manto de calamar gigante eran indistinguibles de las de *Todarodes pacificus*, por lo que el calamar gigante podía sustituirlo como materia prima similar en el mercado japonés, sin precauciones especiales.

En el estudio realizado por Albrecht-Ruiz y Solari (2006), se estudiaron aspectos sobre la actividad proteolítica en manto de calamar gigante. Su objetivo fue efectuar una caracterización parcial de la actividad proteolítica del músculo fresco de calamar gigante para conocer los efectos del pH y la temperatura sobre la autólisis, así como el efecto obtenido al aplicar inhibidores de grado alimentario (albúmina de huevo y plasma de bovino) y buffers de citrato.

Se encontró que la actividad proteolítica aumentaba en un rango de 20-50 °C, tanto a pH ácido como alcalino. Asimismo se midió el efecto de inhibidores grado alimentario (albúmina de huevo y plasma de bovino), con el objetivo de ver el efecto de éstos sobre la capacidad de gelificación de surimi de calamar, no encontrando ninguna modificación en las propiedades de los geles formados. Sin embargo, en lo que se refiere a la utilización de buffers de citrato, se encontró que éste lograba disminuir el sabor ácido-amargo característico del músculo de calamar.

Por su parte Dublan-García *et al.* (2006) determinaron la actividad proteolítica en el manto de

calamar gigante y encontraron que había actividad proteolítica a pH ácido y neutro y que para todos los pH esta actividad tenía como temperatura óptima 35 °C. Además se probaron distintos inhibidores y se encontró que entre ellos la quimostatina, la pepstatina y la leupeptina, tuvieron un mayor efecto inhibitorio (82, 87 y 68 %, respectivamente, lo cual indica la presencia de proteasas aspárticas y cisteína proteasas) mientras que el inhibidor de tripsina, el EDTA y el pirofosfato inhibieron la proteólisis en un 50 %.

El perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar indicó que éstas tienen pesos moleculares en un intervalo de 11 a 395 kDa, lo cual abarca el peso molecular para muchas proteasas. Por lo que llegó a la conclusión de que en el músculo de calamar gigante se encontraban un conjunto de proteasas, tales como serina proteasas, metaloproteasas y cisteína proteasas. También evaluaron el músculo de calamar gigante y evaluó los cambios estructurales y fisicoquímicos en el manto durante el almacenamiento en refrigeración o congelación. Encontraron que al mantener el manto de calamar almacenado en congelación no se perdía la actividad de las proteasas presentes y que por lo tanto estas pueden modificar tanto las propiedades estructurales como las reológicas del músculo durante su almacenamiento y procesamiento posterior.

Estudios de Actividad Proteolítica Específica en Calamar Gigante

Una de las formas en que pueden ser estudiadas las proteasas es agrupándolas en cuatro grupos: Proteasas ácidas o aspárticas, tiol o cisteína proteasas, serina proteasas y metaloproteasas.

Las proteasas aspárticas se caracterizan por su alta actividad y estabilidad a pH ácido. Ya en los estudios antes mencionados se hablaba de la presencia de actividad enzimática a pH ácido, no es de extrañar que se realizaran estudios más específicos en este rango de pH, así Valdez-Ibarra

(2009) realizó un estudio en el cual determinó actividad enzimática en un extracto crudo de hepatopáncreas de calamar gigante. Primero realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio, después un ensayo enzimático con hemoglobina desnaturalizada con ácido como sustrato y para finalizar un ensayo de inhibición con diferentes tipos de inhibidores, donde la pepstatina (inhibidor específico de proteasas aspárticas) presentó el mayor porcentaje de inhibición, confirmándose de esta manera la presencia de proteasas aspárticas en el hepatopáncreas de calamar gigante.

Dentro de las cisteína proteasas, Cárdenas-Lopez y Haard (2005; 2009) realizaron experimentos importantes. Ellos realizaron una autólisis experimental en extracto crudo de hepatopáncreas, en el que encontraron dos picos de máxima autólisis a pH de 3 y 5. Tomando la fracción enzimática a pH 5, por ser la más cercana a la neutralidad, se decidió buscar la enzima o enzimas responsables de la proteólisis a este pH. Después de medir actividad enzimática y realizar ensayos de inhibición, se encontró que la actividad enzimática era del tipo cisteína proteasa. Después se llevó a cabo la purificación en dos pasos: mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de filtración en gel, obteniéndose una fracción que fue sometida a ensayos enzimáticos y ensayos de inhibición con sustratos e inhibidores específicos de cisteína proteasas. La enzima cuya presencia fue confirmada mediante técnicas proteómicas fue la catepsina L.

Osuna-Ruiz *et al.* (2010) también realizaron una importante aportación al conocimiento de las enzimas de calamar gigante al realizar la purificación, caracterización e hidrólisis de caseína de una aminopeptidasa en el hepatopáncreas.

Fuera del grupo de las peptidasas, hay otras hidrolasas de interés como son las enzimas AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa. La obtención del índice de frescura en los productos pesqueros está directamente ligada a la degradación del ATP. Sin

embargo, en el calamar el índice de frescura determinado por métodos tradicionales no es aplicable. En el caso del calamar la degradación del ATP ocurre de una forma significativamente más rápida y esto hace que el resultado indique una completa pérdida de frescura cuando no es así. El estudio realizado por Marquez-Rios *et al.* (2008) explica este comportamiento. La enzima AMP deaminasa cataliza la deaminación irreversible de AMP a amoniaco y tiene un importante papel bioquímico y fisiológico en el metabolismo energético al competir con la enzima 5'-nucleotidasa por el AMP disponible. Purificaron la enzima AMP deaminasa y encontraron que la degradación del ATP en calamar seguía un patrón diferente al encontrado en peces, de tal forma que después de 24 horas de almacenamiento en hielo el nivel de ATP era muy bajo, mientras que el nivel de hipoxantina (Hx) era muy alto. Para poder medir frescura en calamar es necesaria una relación de los metabolitos más gradual, por lo que se sugirió que el índice Hx/AMP podría ser un mejor indicador de frescura. Asimismo, Pacheco Aguilar *et al.* (2010; 2009) purificaron y caracterizaron parcialmente la enzima 5-nucleotidasa encontrando que la enzima es regulada por cationes mono y divalentes así como ATP y ADP y aumenta su actividad cuando disminuye significativamente el ATP, aumentando los niveles de ADP lo suficiente para una buena acción de la enzima. Además encontraron que la enzima también está regulada por la carga energética adenilada.

Liasas, Isomerasas y Ligasas

Siguiendo con los grupos enzimáticos, por último mencionaremos a una enzima que se encuentra en el grupo de las liasas. Esta enzima es la óxido de trimetilamina demetilasa (conocida como TMAOasa). Esta enzima cataliza la conversión del óxido de trimetilamina (TMAO) a dime-tilamina (DMA) y formaldehído (FA) que son productos de la degradación de productos pesqueros, por lo tanto indeseables, ya que pueden influir en la formación de agregados proteicos y por ende en

la textura del producto (Badii y Howell, 2002; Benjakul *et al.*, 2004).

Fu *et al.* (2006) encontraron que esta enzima presenta una temperatura óptima relativamente alta y buena estabilidad térmica, es decir, la enzima es capaz de causar un daño potencial en el calamar al producir gran cantidad de dimetilaminas y formaldehído durante el proceso de calentamiento, aunque resultó ser inhibida significativamente por polifenoles del té, ácido fítico y ácido acético.

En cuanto a las isomerasas y las ligasas no hay enzimas documentadas aún en el calamar gigante.

CONCLUSIONES

A pesar de la importancia económica del calamar gigante, la información respecto a sus enzimas en general sigue siendo escasa. Con respecto a los grupos de enzimas, las proteasas han sido las más estudiadas y aunque hay aplicaciones prospectivas de las enzimas que se han estudiado, todavía falta mucho conocimiento acerca de sus características, sus implicaciones en el metabolismo del calamar gigante, y sus usos como herramientas analíticas.

REFERENCIAS

- Albrecht-Ruiz, M. y Solari, A. 2006. Aspectos de actividad proteolítica en el músculo de pota. Boletín de Investigación del Instituto Tecnológico Pesquero de Perú. 7:31-37.
- Badii, F. y Howell, N. 2003. Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 1440-1446.
- Benjakul, S., Visessanguan, W. y Tanaka, M. 2003. Partial purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 135: 359-371.
- Cárdenas-López, J. L. y Haard, N. F. 2005. Cysteine and proteinase activity in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts. *Journal of Food Biochemistry*. 29, (2):171-186.
- Cárdenas-López, J. L. y Haard, N. F. 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. *Food Chemistry*. 112: 442-447.
- CONAPESCA 2010. Anuario estadístico de acuicultura y pesca. SAGARPA, Ed.; Gobierno federal mexicano.
- Dublán-García, O., Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I. y 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
- Ehrhardt, N., Jacquemin F., García B., González D., López B., Ortiz C. y Solís, N. 1983. On the fishery and biology of the giant squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, México. *En Advances in Assessment of World Cephalopod Resources* (J.F. Caddy, ed), FAO Fisheries technical papers.
- Ezquerro-Brauer, J. M., Haard, N. F., Ramirez-Olivas, R., Olivas-Burrola, H. y Velazquez-Sanchez, C. J. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of Food Biochemistry*. 26, (5):459-475
- Fu, X.-Y., Xue, C.-H., Miao, B.-C., Liang, J.-N., Li, Z.-J. y Cui, F.-X. 2006. Purification and characterization of trimethylamine-N-oxide demethylase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 968-972.
- Haard, N. F. 1994. Protein hydrolysis in seafoods. *En Seafood Chemistry. Processing Technology and Quality*. C. H. F. Shahidi and J.R. Botta (Ed.), p. pp.10-33., New York, .
- Klomkiao, S. 2008 Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla.
- Konno, K., Young-Je, C., Yoshioka, T., Shinho, P. y Seki, N. 2003. Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Dosidicus gigas*. *Fisheries Science*. 69: 204-209.
- Luna-Raya, M. C., Urciaga-García, J.I., Salinas-Zabala, C.A., Cisneros-Mata, M.A. y Beltrán-Morales, L.F. 2006. Diag-

- nóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. *Economía, Sociedad y Territorio*. VI: 535-560.
- Marquez-Rios, E., Pacheco-Aguilar, R., Castillo-Yañez, F. J., Figueroa-Soto, C. G., Ezquerra-Brauer, J. M. y Gollas-Galvan, T. 2008. Isolation and properties of AMP deaminase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle from the Gulf of California, Mexico. *Food Chemistry*. 110, (1):69-75.
- Osuna-Ruiz, I., Yepiz-Plascencia, G., Rouzaud-Sandez, O. y Ezquerra-Brauer, J. M. 2010. Aminopeptidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas: purification, characterisation, and casein hydrolysis. *International Journal of Food Science & Technology*. 45, (2):387-394.
- Pacheco-Aguilar, R., Ocaño-Higuera, V. M., Ezquerra-Brauer, J. M., Castillo-Yañez, F. J., García-Sánchez, G. y Marquez-Rios, E. 2010. Partial characterization of 5'-nucleotidase from giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *CyTA - Journal of Food*. 8: 65 - 71.
- Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J. C., Castillo-Yañez, F. J., Peña-Ramos, E. A., Valenzuela-Soto, E. M.M, y Marquez-Rios, E. 2009. Isolation and properties of 5'-nucleotidase isolated from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle from the Gulf of California, Mexico. *Food Chemistry*. 112: 880-884.
- Ramirez-Olivas, R. Actividad proteolítica y su relación con cambios en textura del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, 2000.
- Ramirez-Olivas, R., Rouzaud Sández, O., Haard, N. F., Pacheco Aguilar, R. y Ezquerra Brauer, J. M. 2004. Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*. 219: 312-315.
- Shahidi, F. y Janak Kamil, Y. V. A. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*. 12: 435-464.
- Torres-Arreola, W., Ezquerra-Brauer, J. M., Figueroa-Soto, C. G., Valenzuela-Soto, E. M., Garcia-Sanchez, G., Marquez-Rios, E. y Pacheco-Aguilar, R. 2011. Lysyl oxidase from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle: detection and partial purification. *International Journal of Food Science & Technology*. 46: 1711-1715.
- Valdez - Ibarra, F. J. Aislamiento y caracterización parcial de proteasa(s) aspártica(s) del hepatopáncreas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, 2009.
- Whitaker, J. R. 1994. *Principles of Enzimology for the Food Sciences*, Second ed.; Marcel Dekker.