

# PROTEASES E INIBIDORES NO PROCESSAMENTO DE SURIMI

## PROTEASES AND INHIBITORS IN SURIMI PROCESSING

KUHN, Cáudio R. & SOARES, Germano J. D.

### - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

#### RESUMO

A revisão aborda estudos sobre a funcionalidade do concentrado protéico de pescado, que é considerado básico no processamento do surimi e no mecanismo de formação do gel. A qualidade do gel de surimi depende da manutenção da estrutura protéica, que retém, na rede tridimensional formada, um adequado número de moléculas de água. Proteases musculares, principalmente as neutras e termoestáveis, desnaturam a proteína miofibrilar durante a estocagem, interferindo nos níveis de interação proteína-proteína e provocando o enfraquecimento do gel. Para inibir essa desnaturação protéica utilizam-se compostos que não interfiram nas propriedades sensoriais do produto. Os principais inibidores são compostos que reagem com os grupamentos sulfidrílicos, destacando-se aqueles de natureza protéica, como a proteína do plasma bovino (PPB),  $\gamma$ -globulina e a ovoalbumina. Diferenças no mecanismo de inibição e na velocidade de autólise muscular entre as espécies de pescado, são fundamentais para avaliar as potencialidades dos inibidores de proteases. Apesar de avanços na pesquisa, o tema ainda permanece um campo aberto à investigação (76 referências).

Palavras chave: Surimi, Gel, Proteases e Inibidores.

#### INTRODUÇÃO

Surimi é um produto oriundo de músculo de pescado, constituído por proteínas solúveis em soluções salinas, principalmente miofibrilares. Estas, são extraídas a partir da carne de pescado mecanicamente separada (CPMS), na fase inicial do processo, formando um concentrado de alta qualidade nutritiva e excelente funcionalidade (BORDERÍAS & TEJADA, 1987; SUZUKI, 1987; TEJADA, 1991).

O incremento na produção de surimi ocorreu somente na década de 60, quando se constatou que determinados carboidratos protegem as proteínas solúveis (miofibrilares) no estado congelado da miofibrila, propiciando um produto final extraordinariamente estável. Isso garantiu e ampliou o tempo de comercialização de surimi, que passou a não mais depender de capturas sazonais dos pescados (TEJADA, 1991).

A utilização da CPMS, é um caminho para diversificar e melhorar o aproveitamento dos recursos pesqueiros, incluindo o pescado de água doce. A grande vantagem do surimi está na melhor comercialização do pescado como um produto mais nobre. A sua produção em larga escala, permite que outros produtos derivados de surimi, de alto valor agregado, possam atingir determinados segmentos do mercado, ou mesmo quando transformados em produtos mais simples, que

atendam à necessidade social de demanda por proteína de origem animal de primeira qualidade. Além disso, a produção de surimi possibilita também a criação de indústrias integradas, como as produtoras de sabor e aroma e da aqüicultura em nosso país. A implantação de uma linha de produção de surimi, também propicia à indústria pesqueira um aproveitamento mais racional dos resíduos, como o descarte do processo de filetagem, com maior teor protéico e valor agregado, além de gerar novos empregos dentro do setor pesqueiro e alimentício (KUHN & PRENTICE, 1999).

Há dois tipos de surimi: um sem sal, obtido pela mistura da polpa de pescado com açúcar e polifosfato, denominado surimi-mu-en; e outro, denominado surimi-ka-en, cujo processamento é idêntico, porém adiciona-se sal à polpa, juntamente com o açúcar e polifosfato (SUZUKI, 1987). Ambos são concentrados protéicos e a sua aplicação, além do aspecto nutricional, decorre principalmente das propriedades funcionais dessas proteínas. O concentrado protéico é empregado na elaboração de produtos tipo "kamaboko", bastante consumidos no Japão. Esses produtos são géis termoestáveis formados no aquecimento do surimi, previamente tratado com sal para solubilização de sua proteína (BORDERÍAS & TEJADA, 1987; SUZUKI, 1987; MORAIS, 1994). Há referências mencionando que o surimi vem sendo utilizado no Japão desde o século IX na elaboração de produtos cuja denominação depende da região geográfica ou dos diferentes ingredientes (SUZUKI, 1987). Contudo, a importância e o crescimento da indústria de produtos a base de surimi no mundo ocidental, iniciou-se no final dos anos 70 e começo da década de 80, com o surgimento dentro do mercado norte-americano de produtos conhecidos genericamente como análogos, e que são, fundamentalmente, simulações de carne de mariscos, crustáceos e outros de igual importância (LEE, 1984). Atualmente, usa-se o surimi como ingrediente em vários alimentos a base de pescado, entre os quais destacam-se os escalopes e a fina culinária dos pratos de lagostas, caranguejos, siris, etc. A popularidade dos produtos a base de surimi, especialmente os análogos a caranguejo, vem estimulando investimentos nas indústrias alimentícias do setor pesqueiro dos Estados Unidos e Europa (LEE, 1984; LANIER & LEE, 1992).

Processamento de surimi:

O método de elaboração do surimi está baseado na eliminação das proteínas sarcoplasmáticas (que impedem a

Depto. de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, FAEM/UFPel. Cx. P. 354. CEP: 96010-900. Pelotas - RS

(Recebido para publicação em 04/12/2001)

correta formação do gel), de gorduras (removidas por floculação), pigmentos, substâncias odoríferas e óxido de trimetilamina (OTMA), mediante uma série de lavagens da carne de pescado mecanicamente separada em água e soluções de cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio (SATO & TSUCHIA, 1992).

A extração das proteínas miofibrilares do músculo de pescado triturado é realizada em solução salina neutra (salting-out), numa força iônica superior a 0,15 (ou oscilando de 0,1 até 0,3) o que permite isolá-las das sarcoplasmáticas, pois estas são proteínas solúveis em água ou em baixa força iônica. As proteínas sarcoplasmáticas podem ser obtidas por simples pressão sobre o músculo de pescado em água, ou aplicando uma força iônica, que pode ser definida pela equação:  $I = C_i \cdot Z_i^2$ , onde  $C_i$  é a concentração molar e  $Z_i$  é a carga iônica do íon na solução; o que possibilita otimizar a extração das miofibrilares (CONTRERAS, 1994; SIKORSKI, 1994; KUHN & PRENTICE, 1999). A actina e a miosina são extraídas simultaneamente transformando-se em actomiosina (F-actina+miosina).

As proteínas miofibrilares, que representam 66-77% das proteínas totais, têm um papel fundamental na coagulação e formação de gel, quando se processa o músculo de pescado. Estas formam as miofibrilas, e conferem às células musculares sua propriedade contrátil, influenciando tecnologicamente nas qualidades culinárias e comerciais das carnes, pois são responsáveis pela capacidade de retenção de água, propriedades emulsificantes e também pela brandura da carne, contendo ainda quantidades importantes de aminoácidos essenciais, contribuindo assim em mais de 70% do suporte protéico devido ao consumo de carne. Músculos brancos de pescado contêm menos proteínas miofibrilares do que os vermelhos (SIKORSKI, 1994; ISHIKAWA et al., 1997). No músculo aquecido, as proteínas sarcoplasmáticas, coaguladas pelo calor, aderem-se às proteínas miofibrilares e impedem a formação de gel a partir do músculo de pescado (SUZUKI, 1987).

O gel de surimi tem em sua textura, uma particularidade que o diferencia dos géis formados por outras proteínas de origem animal. A textura do gel, perceptível à mastigação, é muito similar a do pescado "in natura". Essa característica pode ser expressa em termos de força de gel, que vem a ser o principal indicador da qualidade e conseqüentemente, do preço final do produto (AN et al., 1996).

No surimi, a formação do gel ocorre a temperaturas inferiores a 40°C (TEJADA, 1991). Na temperatura de 40°C e com adição de NaCl, forma-se um gel translúcido, "suwari", que tem sido associado com a atividade da transglutaminase. Esse gel é formado pela solubilização das proteínas miofibrilares que, ao hidratar-se, cria uma rede protéica unida por pontes de hidrogênio. Ao aumentar lentamente a temperatura do gel a 60°C ou deixando-o à temperatura ambiente, obtém-se o "modori", que é o fenômeno de quebra ou ruptura da estrutura desta rede protéica, atribuído à ação de proteases termoestáveis que podem degradar a miosina rapidamente. O "suwari", quando aquecido a 90°C, forma um gel opaco denominado "kamaboko". Nesse gel a actomiosina, induzida por efeito do calor, aprisiona moléculas de água através de ligações cruzadas e interações hidrofóbicas (BORDERÍAS & TEJADA, 1987 E YONGSAWATDIGUL et al., 1995).

O mecanismo de formação do gel ocorre em dois estágios. Um envolve o desdobramento inicial da proteína e o outro, a sua agregação. O aquecimento da molécula protéica enfraquece as ligações que mantêm as estruturas secundárias

e terciárias. Ao ocorrer a desnaturação térmica, as moléculas protéicas começam a se desdobrar, aumentando a quantidade de água ligada à proteína. A interação subsequente proteína-proteína produz uma rede tridimensional capaz de reter as moléculas de água, formando-se o gel. Aumento de viscosidade em redes tridimensionais mais fracas possibilita uma fluidez na estrutura e o gel verdadeiro não é formado. Por outro lado, fortes interações entre moléculas de proteína produzem um colapso na rede e a água é expelida da estrutura. Um balanço entre forças repulsivas e atrativas é, portanto, importante para a formação adequada da estrutura do gel (MANGINO, 1992).

A estabilidade ao congelamento-descongelamento é fundamental para a qualidade do surimi. Os chamados crioprotetores atuam aumentando a tensão superficial da água em torno da proteína, impedindo o seu congelamento. Esse fenômeno previne a retirada da água ligada à proteína, estabilizando-a em sua forma original durante o período de estocagem sob congelamento (MACHADO, 1994; SIKORSKI, 1994).

Substâncias com alta capacidade de hidratação e baixo ponto de fusão, que permaneçam estáveis em baixas temperaturas e cujas moléculas não exerçam força de atração entre si, são consideradas crioprotetoras. Entre as substâncias com essa natureza química, destacam-se os aminoácidos e peptídeos, ácidos carboxílicos, mono e dissacarídeos, polióis e sais, principalmente os polifosfatos (SIKORSKI, 1994).

O efeito crioprotetor dos carboidratos (arabinose, galactose, lactose, glicerol, sorbitol, etc.) está na atração das moléculas do açúcar sobre a superfície molecular da proteína, formando enlaces do tipo dipolo-dipolo que impedem a rearticulação da miosina. A escolha do carboidrato depende de sua estrutura espacial e do número de grupos OH presentes, por que ao dissolver-se na água junto a miofibrila, essas hidroxilas combinam-se com aqueles grupos carregados negativamente da molécula protéica (efeito eletrostático), formando grandes aglomerados que envolvem a proteína, protegendo-a (MORAIS, 1994).

Há ainda, o efeito protetor sinérgico do fosfato (neutro ou alcalino) com o açúcar, na pasta de pescado (concentrado protéico), principalmente porque reduz as perdas por exsudação durante o descongelamento. Os fosfatos também podem agir como seqüestrantes ou precipitantes ao diminuir a presença de íons metálicos como cálcio, magnésio, ferro e cobre, que podem atribuir efeito indesejável no alimento, como descoloração e sabor (IFT, 1990). Além disso, podem incrementar a capacidade de retenção de água das proteínas, sua solubilização e conseqüentemente a força de gel (VAN WAZER, 1971; ELLINGER, 1972). Ao formar complexos com os íons magnésio, tanto os fosfatos como os piro ou polifosfatos, previnem a formação de estruvite, que são cristais transparentes de fosfato de magnésio e amônio, com aspecto vítreo (ELLINGER, 1972a).

#### Atividade proteolítica no pescado:

No músculo de pescado, como em outros tecidos, ocorrem numerosas enzimas proteolíticas, todas próximas, as quais são reguladas *in vivo* pela regulação múltipla de cofatores ou compartilhamento. Durante a extração das proteínas miofibrilares grande parte dessa organização é perdida, ocasionando modificações autolíticas *post mortem* no músculo de pescado, principalmente no posterior processamento do mesmo (STOKNES & RUSTAD, 1995).

As miofibrilas são suscetíveis à autólise por ação das proteinases musculares endógenas. A atividade entre as numerosas proteinases presentes no músculo varia conforme a espécie do pescado. Entretanto, é possível destacar a atividade proteolítica de dois grandes grupos: as catepsinas e as peptidases alcalinas estáveis ao calor. A degradação das miofibrilas, especialmente a miosina, prejudica a qualidade do surimi, com a perda substancial da força de gel (MORRISSEY et al., 1993).

No músculo de pescado é alta a atividade proteolítica mediada pela catepsina-L, pois essa enzima tem alta afinidade pela miosina e não é completamente removida pelo processo de lavagem na elaboração do surimi (AN et al., 1994, 1996).

A desnaturação da proteína durante a estocagem de pescado congelado decorre de alterações ou modificações conformacionais das proteínas miofibrilares, ou mais especificadamente, da agregação causada pelo progressivo aumento das ligações intermoleculares da miosina, as quais envolvem ligações de hidrogênio, iônicas, hidrofóbicas e pontes de dissulfetos (JARENBACK & LILJEMARK, 1975). A conformação nativa da miosina é fundamental para a formação do gel. Não se consegue obter a máxima força de gel quando a miosina for desnaturada antes da gelatinização. Resíduos de aminoácidos hidrófobos de actomiosina, exposta ao congelamento, são oriundos, principalmente, de componentes da miosina, indicando que o congelamento teve mínimo efeito sobre o componente actina. Ao repetir-se o processo de congelamento-descongelamento do surimi de merluza da Antártida (*Merluccius spp*) e de truta (*Salmo gairdneri*), observa-se aumento na desnaturação da miosina, com substancial diminuição da força do gel (AN et al. 1996).

A desnaturação, seja pela atividade proteolítica ou pelo aquecimento da proteína, permanece a principal causa de alteração da textura e enfraquecimento do gel de surimi, embora não se tenha a comprovação definitiva do fenômeno (MAKINODAN et al., 1963; MAKINODAN & YKEDA, 1971; NIWA et al., 1975; IWATA et al., 1977; LANIER et al., 1981).

A textura do gel da proteína de pescado degrada-se próximo aos 60°C, mas é um fenômeno ulterior, ou seja, somente vai ocorrer após a formação da estrutura desse gel (SHIMIZU et al., 1962). Portanto, primeiro forma-se o gel de actomiosina, que posteriormente sofrerá degradação devido a um conjunto de fatores que interfere na estrutura do gel no aquecimento.

Segundo MORRISSEY et al. (1993), há desaparecimento da meromiosina pesada (MMP) com o aumento no tempo de aquecimento da proteína. Por outro lado, a pirólise da actomiosina do músculo de pescado não ocorre abaixo de 100°C (SEKI, 1976). Portanto, o desaparecimento da meromiosina pesada (MMP) a 62°C, depende exclusivamente da hidrólise da proteína, através da ação proteolítica.

MAKINODAN et al. (1963) foram os primeiros autores a descrever a degradação textural dos géis de proteína de pescado, quando aquecidos a uma temperatura de 60-70°C, pela ação de proteases termoestáveis. Embora seja possível uma atividade ótima da catepsina-D à temperatura de 60°C e pH 3, a mesma não pode ser confirmada no músculo do pescado, provavelmente devido ao seu alto valor de pH (MAKINODAN et al., 1985). Anteriormente, comparando a atividade de protease muscular de várias espécies de pescados, os mesmos autores (MAKINODAN et al., 1984) encontraram maior nível de atividade enzimática na truta arco-íris (*Salmo gairdneri*). Para IWATA et al. (1974), o músculo da truta arco-íris tem menor atividade de protease alcalina, à temperatura de 60-65°C, comparado com músculos de vários peixes de água doce e salgada.

A importância da cisteína na textura do gel é devido a sua termoestabilidade e habilidade para clivar ligações peptídicas internas, produzindo cadeias peptídicas curtas, enquanto as exopeptidases somente podem clivar ligações peptídicas terminais (AN et al., 1996). Para YAMASHITA & KONAGAYA (1990, 1991, 1991a), tanto as catepsinas B e L como a cisteína podem abrandar a textura do músculo de salmão no período *postmortem*, e em períodos de migração para desova, onde foi notado um extensivo abrandamento do músculo.

Durante o processamento do surimi de merluza comum (*Merluccius argentiniensis*), ocorre uma remoção seletiva das proteases, efetuada durante as etapas de lavagem e drenagem, sendo removidas em sua maior parte, as catepsinas B e H. A catepsina L, entretanto, não foi removida no processamento do surimi, e mostrou maior atividade a 55°C, contribuindo para a sua hidrólise, sendo a principal protease a contribuir para a degradação da textura e conseqüente diminuição na força do gel. As catepsinas B e H mostraram maior atividade na faixa de temperatura de 20 a 37°C, não contribuindo assim, para a degradação do surimi no processo convencional de aquecimento (AN et al., 1994; MORRISSEY et al., 1993).

As atividades das enzimas proteolíticas diferem entre espécies ou até na mesma espécie de pescado, como as diferenças entre as proteases do tubo digestivo do salmão do Atlântico (TORRISSEN & TORRISSEN, 1985), ou das catepsinas, no músculo do salmão no período da migração para a desova (KONAGAYA, 1982; ANDO et al., 1985).

Outras proteases, denominadas cálcio-dependentes, collagenases e proteases neutras e enzimas digestivas, como tripsina, podem ter contato direto com o músculo de pescado. Proteases neutras têm hemoglobina como substrato e maior atividade entre pH 6,5 e 7, diminuindo-a quase totalmente na faixa de 55°C, enquanto as calpaínas, utilizando caseína como substrato, atingem atividade ótima em pH 7-8 e 30°C, perdendo-a na temperatura de 45°C (ASHIE et al., 1996; MAKINODAN et al., 1985).

A protease neutra pode atuar sobre a proteína durante a preparação da polpa, influenciando o gel das proteínas miofibrilares de pescado. Não se pode dizer se a calpaína atua durante a preparação da CPMS, porque a calpastatina, um inibidor específico para a calpaína, também existe naturalmente no músculo de pescado (TOYOHARA et al., 1983).

A protease alcalina termoestável tem sido apontada como a responsável pela degradação textural do gel de surimi. Sua atividade foi demonstrada no músculo de uma grande variedade de espécies de pescado, tendo sido caracterizada em estreita faixa de pH (próximo a 8,0) e temperatura ótima entre 50 e 70°C (MAKINODAN & IKEDA, 1969; NOMATA et al., 1985; TOYOHARA et al., 1987; BOYE & LANIER, 1988; YANAGIHARA et al., 1991; WASSON et al., 1992; AN et al., 1996). A protease alcalina atua não só em substratos exógenos, mas na proteína miofibrilar isolada (MAKINODAN & IKEDA, 1971; LIN & LANIER, 1980). Esta enzima hidrolisa a proteína do músculo ao redor de 60°C e numa faixa de pH neutro. A simetria entre as curvas de atividade autolítica e força de gel vs temperatura, sugere fortemente uma relação da enzima com a degradação textural (MAKINODAN et al., 1985). O aquecimento a 65°C das miofibrilas do músculo de salmão do atlântico (*Salmo salar*), provocou, inicialmente, forte ativação das proteases alcalinas. O aquecimento adicional de 10 minutos, nessa mesma temperatura, já induz um predominante mecanismo de desnaturação da enzima (STOKNES & RUSTAD, 1995).

STOKNES et al.(1993) constataram que protease alcalina de músculo de salmão é mais estável, nas temperaturas mais altas, do que a extraída do músculo de arenque. Para vários autores (MAKINODAN & IKEDA, 1977; TOYOHARA et al., 1987; KINOSHITA et al., 1990), a protease alcalina está na forma latente ou precursora *in vivo*. Essa enzima pode ser induzida a expor seu sítio ativo por ativação artificial, utilizando como aquecimento, adição de uréia ou radiação gama *in vitro*. A protease alcalina de corvina (*Argyrosomus argentatus*) e salmão (*Oncorhynchus keta*) atingiu um ótimo de atividade a 65°C e foi mais estável ao calor do que a protease de corvina. Diferenças na sensibilidade ao aquecimento podem refletir diferenças nas condições de vida do pescado, tais como temperatura da água e salinidade. Salmão do Atlântico, “chum” salmon e truta arco-íris, todos pertencentes à família Salmonidae, adaptam-se a salinidade e temperatura da água (TOYOHARA et al., 1987).

#### Função dos Inibidores de Proteases:

A atividade das proteases sobre o pescado tem um efeito adverso sobre as propriedades de formação do gel no surimi. A rede protéica é formada por ligações cruzadas de actomiosina com ajuda de ligações de hidrogênio e hidrófobas, e a água é retida dentro da estrutura (OKADA, 1963).

A funcionalidade das proteínas miofibrilares pode ser protegida pelo emprego de baixas temperaturas e/ou por tratamento químico. Este último abrange o uso dos inibidores de proteases (SAEKI et al., 1995).

Produtos a base de surimi, preparados com aquecimento mais prolongado, geralmente utilizando forno a seco, podem apresentar maior ação de proteases endógenas e maior degradação textural do gel. A qualidade, na manufatura desses produtos, passa a depender da inibição da degradação (SAEKI et al., 1995). Os aditivos protéicos são amplamente usados como inibidores de proteases, pois melhoram as propriedades físicas do gel de surimi e controlam a atividade das proteinases e sua estabilidade ao aquecimento, evitando a clivagem das proteínas do músculo (CHANG-LEE et al., 1989; MORRISSEY et al., 1993; AN et al., 1996).

A protease, inibida no congelamento, pode ativar-se no momento da elaboração dos produtos a base de surimi, pelo efeito do calor. A sua degradação sobre o gel, dependente de temperatura, foi demonstrada, previamente, no surimi preparado do músculo cortado diretamente do pescado vivo (LANIER, 1985). Demonstrou-se que a fonte do sistema enzimático provém do próprio tecido muscular e não de uma contaminação do intestino para o músculo do pescado, durante a etapa de evisceração ou obtenção da carne de pescado mecanicamente separada (SU et al., 1981), ou ainda de fontes bacterianas, como a infestação por *Myxosporidia spp.*, que são conhecidas por produzirem uma protease com atividade similar àquela presente naturalmente no músculo de pescado (PATASHNIK et al., 1982). Portanto, o controle requer o emprego adequado de inibidores de proteases, que ao evitar a desnaturação, passa a interferir no mecanismo de formação do gel. Ocorre que essa ação proteolítica difere entre os músculos de pescado, segundo as diferentes espécies, ou seja, há diferença na velocidade de autólise e conseqüentemente pode alterar-se o mecanismo inibidor e a possibilidade de obtenção de um gel de surimi com qualidade (YONGSAWATDIGUL et al., 2000).

Os compostos que reagem com grupamentos sulfidrílicos são os mais ativos inibidores (MILLER & SPINELLI, 1982). A eficácia dos inibidores de proteases tem sido testada, particularmente, em espécies de águas polares,

como a merluza da Antártida (*Merluccius spp*) e merluza comum (*Merluccius productus*), verificando-se que há diferentes níveis de enfraquecimento do gel de surimi, conforme a atividade das proteases (YONGSAWATDIGUL et al., 2000).

Pesquisas apontam a proteína do plasma bovino (PPB) como a de melhor desempenho em relação a outros inibidores, principalmente quando se considera a concentração requerida para aumento da força de gel, sem interferência no sabor. O plasma bovino também tem menor custo, em relação a outras substâncias inibidoras. Estas vantagens transformam o PPB num inibidor em potencial (KHAN et al., 1979; LEE et al., 1991).

A albumina do soro, estruturalmente apresenta-se com uma cadeia simples de polipeptídeos, contendo 17 pontes dissulfeto. Essas ligações, estabilizam a molécula em três domínios similares e cada domínio tem um sítio para certas ligações fisiológicas. Ligações com ácidos graxos de cadeia longa, no terceiro domínio (PUTNAM, 1984), estabilizam a proteína e aumentam a temperatura de desnaturação da albumina de soro (GUMPEN et al., 1979; PETERS, 1985). A albumina é uma proteína hidrofóbica com uma estrutura flexível e tem alta afinidade por interfaces ar/água (KATO et al., 1986). No plasma bovino, a  $\gamma$ -globulina foi a mais estável, requerendo uma temperatura maior para desnaturar. As  $\alpha$ -globulinas contem cerca de 20 glicoproteínas e a quantidade de modificações de carboidratos de proteína para proteína alcança até 40% ou mais por peso (PUTNAM, 1984). A boa estabilidade da espuma de  $\alpha$ -globulina pode ser atribuída a seu alto conteúdo em carboidratos, que pode aumentar a viscosidade da lâmina e retardar sua drenagem.

Uma propriedade funcional importante da clara de ovo está na habilidade de sua proteína solúvel coagular durante o aquecimento. A combinação da desnaturação protéica, juntamente com a gelatinização do amido, um produto utilizado como ingrediente em vários produtos a base de surimi, aumenta a viscosidade do produto, prevenindo a coalescência de células de ar e fixando a estrutura interna (SHEPHERD & YOEL, 1976; DONOVAN, 1977). A temperatura de desnaturação da ovoalbumina, principal proteína da clara de ovo, coincide com a gelatinização do amido, possibilitando alcançar um máximo de volume antes da fixação pelo calor (DONOVAN, 1977). A ovoalbumina pode ser convertida para S-ovalbumina, a forma mais estável, apresentando uma temperatura de desnaturação 8°C maior do que a ovoalbumina (DONOVAN & MAPES, 1976). Como a conversão pode ocorrer na estocagem prolongada dos ovos, sempre que esses forem utilizados, há demora na desnaturação, causando um excessivo crescimento do volume e conseqüentemente um colapso estrutural, diminuindo o volume do produto (MEEHAN et al., 1962; DONOVAN, 1977). A clara de ovo tem um custo elevado e pode propiciar odores indesejáveis, em níveis requeridos para inibição das proteases do surimi (PORTER et al., 1993).

O extrato de batata como inibidor, não mostra quaisquer limitações sensoriais, mas causa algum problema de perda na cor do surimi. Pesquisadores propuseram o soro de leite concentrado para enriquecer a força de gel do surimi, em altos níveis, mas até o momento, nenhuma propriedade sensorial negativa foi relatada (CHANG-LEE et al., 1990; RYDER, 1991; AKAZAWA et al., 1993; PIYACHOMKWAN & PENNER, 1995).

A  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e a soralbumina, são os principais constituintes do soro de leite concentrado, sendo a  $\beta$ -lactoglobulina o principal componente presente e principal fonte de grupos sulfidrílicos livres, com seu efeito tornando-se

mais significativo para o incremento na força de gel a valores de pH acima de 7,0 (MANGINO, 1992).

Pesquisas realizadas no surimi de merluza comum (*Merluccius argentiniensis*), utilizando soro de leite concentrado, apontaram para uma concentração mínima de 3% ou mais, para tais proteínas serem utilizadas como inibidoras da protease, produzindo assim um surimi com uma força de gel aceitável comercialmente (PIYACHOMKWAN & PENNER, 1995; WEERASINGHE et al., 1996). Neste caso, a atividade inibitória mais efetiva no surimi de merluza comum foi sobre a protease cisteína, a qual apresenta resíduos no sítio ativo da protease (SEYMOUR et al., 1994). A atividade da papaína diminuiu proporcionalmente com o acréscimo do soro de leite concentrado. Também foi notada uma redução da atividade da tripsina de uma maneira linear dentro da faixa estudada. No entanto, para WEERASINGHE et al. (1996), o PPB, a uma concentração de 1% teve maior eficiência, quando comparado com o concentrado de proteínas do soro de leite, no enriquecimento da força de gel do surimi. As variações de resultados apontam a necessidade de pesquisas tanto nestes quanto em novos inibidores de proteases para aplicação em surimi (AKAZAWA et al., 1993).

## CONCLUSÕES

A qualidade do gel de surimi depende essencialmente da manutenção da sua estrutura protéica, que ao formar uma rede tridimensional adequada, retém um número ótimo de moléculas de água, através de interações proteína-proteína. As proteases neutras e termoestáveis são as principais responsáveis pela desnaturação da proteína miofibrilar e, conseqüentemente, pelo enfraquecimento do gel. A velocidade de autólise protéica varia entre as espécies ou mesmo em indivíduos da mesma espécie de pescado, dependendo do estado fisiológico e condições do habitat. O controle da desnaturação é realizado com o uso de inibidores que atuam principalmente nos grupamentos sulfidrílicos da proteína, aumentando a estabilidade do gel de surimi. Os principais inibidores, com essas características, são os inibidores protéicos como a proteína do plasma bovino, a clara de ovo e proteínas do soro de leite. Avaliar a potencialidade de inibidores e seus efeitos no gel de surimi, permanece ainda um campo aberto à investigação científica.

## ABSTRACT

*The review involves some studies on functional properties of fish protein concentrate that are considered basic for the surimi processing and gel formation mechanism. The gel quality of surimi depends on its structural protein maintenance, which must hold in a three-dimensional formed network, an appropriate number of molecules of water. In processed muscle, the neuter and heat stable proteases denature myofibril proteins during storage that cause a weakening in the gel by modifying protein-protein interactions. To inhibit this protein denaturation compounds that do not interfere in sensory properties of product are used. The main inhibitors are the compounds that react with sulphidrilic groups, specially of protein origin, for example Beef plasm protein,  $\gamma$ -globulin and albumin. The differences in the inhibition mechanism and rate of muscle degradation among fish species are very important for evaluating the protease inhibitor potential. In spite of research advances in the area, it still remains an open field for new studies (76 references).*

*Key words: Surimi, Gel, Proteases and Inhibitors*

## REFERÊNCIAS

- AKAZAWA, H.; MIYAUCH, Y.; SAKURADA, K. et al. Evaluation of proteinase inhibitors in Pacific whiting surimi. **Journal Aquatic of Food Products Technology**, v. 2, n.3, p.79-95, 1993.
- AN, H.; WEERASINGHE, V.; MORRISSEY, M. T. et al. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 1013-1017, 1994.
- AN, H.; PETERS, M. Y.; SEYMOUR, T. A. Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, p. 321 – 326, 1996.
- ANDO, S.; HATANO, M.; ZAMA, K. Deterioration of chum salmon muscle during spawning migration-IV. Changes in serum protease inhibitory activity during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 82B, p.11-115, 1985.
- ASHIE, I. N. A.; SIMPSON, B. K.; RAMASWAMY, H. S. Control of endogenous enzyme activity in fish muscle by inhibitors and hydrostatic pressure using RSM. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 350-356, 1996.
- BORDERÍAS, A. J.; TEJADA, M. El surimi. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 1-14, 1987.
- BOYE, S. W.; LANIER, T. C. Effects of heat-stable alkaline protease activity of atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1340-1342, 1988.
- CHANG-LEE, M. V.; PACHECO-AGUILAR, R.; CRAWFORD, D. L. et al. Proteolytic activity of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and heat-set gel texture. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 1116-1119, 1124, 1989.
- CHANG-LEE, M. V.; LAMPILLA, L. E.; CRAWFORD, D. L. Yield and composition of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and the effect of various proteins additives on gel strength. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 83-86, 1990.
- CONTRERAS, E. S. G. Bioquímica de Pescados e Derivados. **Jaboticabal, FUNEP**. 1994.
- DONOVAN, J. W. A study of the baking process by differential scanning calorimetry. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 28, p. 571-578, 1977.
- DONOVAN, J. W.; MAPES, C. J. A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to S-ovalbumin in eggs. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 27, p. 197-204, 1976.
- ELLINGER, R. H. Some general chemical characteristics of phosphates. Ch. 3 in **"Phosphates as food ingredients"**, p. 3, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1972.
- ELLINGER, R. H. The functions and applications of phosphates in food systems. Ch. 6 in **"Phosphates as food ingredients"**, p. 31. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1972a.
- GUMPEN, S.; HEGG, P. O.; MARTENS, H. Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry. **Biochemical and Biophysics**, Acta 574, p.189-196, 1979.
- INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY. Phosphates improve many foods. **Food Technology**, v. 44, n.4, p. 80-92, 1990.
- ISHIKAWA, N.; NAKAMURA, H.; FUJII, Y. **IBID**, 90, 1997.
- IWATA, K.; KIBASHI, K.; HASE, J. Studies on muscle alkaline protease-5. Effect of carp muscular alkaline protease upon Modori phenomenon in kamaboko production. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v.40, p.1051, 1974.
- IWATA, K.; KIBASHI, K.; HASE, J. Studies on muscle alkaline protease-6. Purification of proteins which induce the modori phenomenon in kamaboko production and of cathepsin A from

- carp muscle. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 40, p. 1051, 1977.
- JARENBACK, L.; LILJEMARK, A. Ultrastructural changes during frozen storage of cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Technology**, v. 10, p. 229-239, 1975.
- KATO, A.; YAMAOKA, H.; MATSUDOMI, N. et al. Functional properties of cross-linked lysozyme and serum albumin. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 34, p. 369-372, 1986.
- KHAN, M. N.; ROONEY, L.; W.; DILL, C. W. Baking properties of plasma protein isolate. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 274-276, 1979.
- KINOSHITA, M.; TOYOHARA, H.; SHIMIZU, Y. Induction of carp muscle multicatalytic proteinase activities by sodium dodecyl sulfate and heating. **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 96B, p.565-569, 1990.
- KONAGAYA, S. Enhanced protease activity in muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during spawning migration. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 48, p.1503, 1982.
- KUHN, C. R.; PRENTICE, C. Estudo tecnológico para obtenção de surimi utilizando resíduos do processamento de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), Cap. 06, In: Prêmio Jovem Cientista: Oceanos, Fonte de Alimentos. Publicação resumida dos trabalhos vencedores. **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq**, Rio de Janeiro, p. 181-211, 1999.
- LANIER, T. Menhaden: soybean of the sea. **University of North Carolina Sea Grant College Publication**, UNC-SG-85-02, Box 8605, North Carolina State Univ., Raleigh, NC 27695-8605, 1985.
- LANIER, T.; LEE, C. M. **Surimi technology**. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992.
- LANIER, T.; LIN, T. S.; HAMMANN, D. D.; THOMAS, F. B. Effects of alkaline protease in minced fish on texture of heat-processed gels. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1643, 1981.
- LEE, C. M. Surimi process technology. **Food Technology**, v. 38, n. 11, p. 69-80, 1984.
- LEE, C. M.; JOHNSON, L. A.; LOVE, J. A. et al. Effects of processing and usage level on performance of bovine plasma as an egg white substitute in cakes. **Cereal Chemistry**, v. 68, p. 100-104, 1991.
- LIN, T. S.; LANIER, T. C. Properties of an alkaline protease from the skeletal muscle of Atlantic croacker. **Journal of Food Biochemistry**, v. 4, p. 17, 1980.
- MACHADO, I. **Surimi e produtos derivados**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, p. 57, 1994.
- MAKINODAN, Y.; HARUHIKO, T.; NIWA, E. Implication of muscle alkaline proteinase in the textural degradation of fish meat gel. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1351-1355, 1985.
- MAKINODAN, Y.; IKEDA, S. Alkaline proteinase of carp muscle: effects of some protein denaturing agents on the activity. **Journal of Food Science**, v. 42, p. 1026-1033, 1977.
- MAKINODAN, Y.; IKEDA, S. Studies on fish muscle protease-II. Purification and properties of a proteinase active in slightly alkaline pH range. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v.35, p. 749-757, 1969.
- MAKINODAN, Y.; IKEDA, S. Studies on fish muscle protease-4. Relation between Himodorinof Kamaboko and muscle proteinase. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 37, p. 518, 1971.
- MAKINODAN, Y.; TOYOHARA, H.; IKEDA, S. Comparison of muscle proteinase activity among fish species. **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 79B, p. 129, 1984.
- MAKINODAN, Y.; YAMAMOTO, M.; SHIMIDU, W. Protease in fish muscle. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 29, p. 776, 1963.
- MANGINO, M. E. Gelation of whey protein concentrates. **Food Technology**, v. 46, n.1, p. 114-117, 1992.
- MEEHAN, J. J.; SUGIHARA, T. F.; KLINE, L. Relationships between shell egg handling factors and egg holding temperatures. **Poultry Science**, v. 41, p. 892-900, 1962.
- MILLER, R.; SPINELLI, J. The effect of protease inhibitors on proteolysis In parasitized Pacific Whiting (*Merluccius productus*) muscle. **Fisheries Bulletin U.S.**, v. 80, p. 281-286, 1982.
- MORAIS, C. **Carne de pescado separada mecanicamente: Obtenção e utilização**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1994.
- MORRISSEY, M. T.; WU, J. W.; LIN, D. et al. Protease inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of Pacific whiting surimi. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 1050-1054, 1993.
- NIWA, E.; NAKAJIMA, G.; HAGIWARA, N. On the retardation of modori in kamaboko processing. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 41, p. 1293, 1975.
- NOMATA, H.; TOYOHARA, H.; MAKINODAN, Y. et al. The existence of proteinases in chum salmon muscle and their activities in the spawnig stage. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 51, p.1799-1804, 1985.
- OKADA, M. Studies of elastic property of kamaboko. **Bulletin of Tokai Register Fisheries Resources**, v.36, p.21, 1963.
- PATASHNIK, M.; CRONINGER, H. S.; BARNETT, H. et al. Pacific whiting (*Merluccius productus*): abnormal muscle texture caused by Myxosporeidan-induced proteolysis. **Marine Fisheries Review**, v. 44, p. 1-12, 1982.
- PETERS, J. Jr. Serum albumin. **Advances in Protein Chemistry**, v. 37, C. B. Anfisen, J. T. Edsall, and F. M. Richards (Ed). Academic Press, New York., p. 161-245, 1985.
- PIYACHOMKWAN, K.; PENNER, M. H. Inhibition of Pacific whiting surimi-associated protease by whey protein concentrate. **Journal of Food Biochemistry**, v. 18, p. 341-353, 1995.
- PORTER, R.; KOURY, B.; KUDO, G. Inhibition of protease activity in muscle extracts and surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). **Marine fisheries Review**, v. 55, p. 10-15, 1993.
- PUTNAM, F. W. Alpha, beta, gamma, omega – the structure of the plasma proteins. In **The Plasma Proteins – structure, functions, and genetic control**, 2<sup>nd</sup> ed., v. 4, F. W. Putnam (Ed). Academic Press, New York, p. 45-166, 1984.
- RYDER, D. N. Study of the use of milk proteins in fish gel products. **Science et technique du froid.**, v. 1990, n. 3, 107-113, 1991.
- SAEKI, H.; ISEYA, Z.; SUGIURA, S. et al. Gel forming Characteristics of frozen surimi from chum salmon in the presence of protease inhibitors. **Journal of Food Science**, v. 60, p.917-928, 1995.
- SATO, S.; TSUCHIA, T. Microstructure of surimi based products. In: LANIER, T. C. & LEE, C. M. (eds.). **Surimi Technology**. New York, Marcel Dekker, p. 501-519, 1992.
- SEKI, N. Identification of fish species by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the myofibrillar proteins. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 42, p. 1169, 1976.
- SEYMOUR, T. A.; MORRISSEY, M. T.; PETERS, M. Y. et al. Purification and characterization of pacific whiting proteases. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p.2421-2427, 1994.

- SHEPHERD, I. S.; YOEL, R. W. Cake emulsions. **Food Emulsions**, S. Friberg, (Ed). Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 5, p. 215-275, 1976.
- SHIMIZU, Y.; YOSHIMOTO, H.; SHIMIDU, W. Studies on 'Ashi' of kamaboko-12. Fall in gel strength of kamaboko during cooking. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 28, p. 260, 1962.
- SIKORSKI, Z. E. Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación. **Zaragoza, España. Ed. Acribia, S. A.**, 1994.
- STOKNES, I.; RUSTAD, T. Proteolytic activity in muscle from Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Journal of Food Science**, v. 60, n. 4, p. 711-714, 1995.
- STOKNES, I.; RUSTAD, T.; MORR, V. Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea arengus*). **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 106B, p. 613-619, 1993.
- SU, H.; LIN, T. S.; LANIER, T. C. Investigation into potential sources of heat-stable alkaline protease in mechanically separated Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*). **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1654, 1981.
- SUZUKI, T. **Tecnología de las proteínas de pescado y krill**. Zaragoza, España. Editorial Acribia S. A., 1987.
- TEJADA, M. Tendencias actuales en la utilización de surimi. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 310-318, 1991.
- TOYOHARA, H.; MAKINODAN, Y., TANAKA, K. **et al.** Detection of calpastatin and trypsin inhibitor in carp muscle. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 47, p. 1151, 1983.
- TOYOHARA, H.; NOMATA, H.; MAKINODAN, Y. **et al.** High molecular weight heat-stable alkaline proteinase from white croaker and chum salmon muscle: comparison of the activating effects by heating and urea. **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 86B, p. 99-102, 1987.
- TORRISSEN, K. R.; TORRISSEN, O. J. Protease activities and carotenoid levels during the sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 50, p. 113-122, 1985.
- VAN WAZER, J. R. Chemistry of the phosphates and condensed phosphates. In **"Symposium: Phosphates in food processing"**, Ed. J. M. Deman and P. Melnychyn, The AVI Pub. Co., Inc., Westport, Conn. Ch. 1, p. 1, 1971.
- WASSON, D. H. Fish muscle proteases and heat-induced myofibrillar degradation: A review. **Journal of Aquatic Food Products Technology**, v. 1, p. 23-41, 1992.
- WEERASINGHE, V. C.; MORRISSEY, M. T.; AN, H. **et al.** Whey protein concentrate as a proteinase inhibitor in Pacific whiting surimi. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 367-371, 1996.
- YAMASHITA, M.; KONAGAYA, S. Participation of cathepsin-L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 56, p. 1271-1277, 1990.
- YAMASHITA, M.; KONAGAYA, S. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 57, p. 1917-1922, 1991.
- YAMASHITA, M.; KONAGAYA, S. Proteolysis of muscle proteins in the extensively softened muscle of chum salmon caught during spawning migration. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 57, p. 2163, 1991a.
- YANAGIHARA, S.; NAKAOKA, H.; HARA, K. **et al.** Purification and characterization of serine proteinase from white croaker skeletal muscle. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 57, p. 133-142, 1991.
- YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J. W.; MORRISSEY, M. T. **et al.** Ohmic heating maximizes gel functionality of Pacific whiting surimi. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 10-14, 1995.
- YONGSAWATDIGUL, J.; PARK, J. W.; VIRULHAKUL, P. **et al.** Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 129-133, 2000.