



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

**INIBIDORES DE PROTEASES NA QUALIDADE DO GEL DE *SURIMI* DE
SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADA-FOGUETE
(*MACRODON ANCYLON*)**

CLÁUDIO RAFAEL KUHN
Engenheiro de Alimentos

Pelotas – Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2003.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

**INIBIDORES DE PROTEASES NA QUALIDADE DO GEL DE *SURIMI* DE
SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADA-FOGUETE
(*MACRODON ANCYLONDON*)**

CLÁUDIO RAFAEL KUHN
Engenheiro de Alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia ‘Eliseu Maciel’, Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. Dr. Germano Jorge Dornelles Soares, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Pelotas – Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro de 2003.

CLÁUDIO RAFAEL KUHN

Engenheiro de Alimentos

INIBIDORES DE PROTEASES NA QUALIDADE DO GEL DE *SURIMI* DE
SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADA-FOGUETE
(*MACRODON ANCYLONDON*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel', Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada: 28 de fevereiro de 2003.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Dr. Germano Jorge Dornelles Soares - FAEM – UFPel

Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández - DQ – FURG

Dr. João Luiz da Silva Vendruscolo - EMBRAPA

Pelotas - Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro de 2003.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández – DQ – FURG

Prof. Dr. Milton Luís Pinho Espírito Santo – DQ – FURG

Prof. Dr. Juvêncio Luís Osório Fernandes Pouey – DZ – UFPel

Prof. Dr. Germano Jorge Dornelles Soares – FAEM – UFPel – Orientador.

A Deus, meus pais e à minha querida esposa Ana e filha Helena.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Germano Jorge Dornelles Soares, pelos ensinamentos, pela convivência e amizade, uma referência como profissional.

Ao professores Carlos Prentice-Hernández e João Vendruscolo, pelo apoio e colaboração, sem nunca hesitar.

Aos professores do DCTA, pelos valiosos ensinamentos, colaboração e convívio.

Aos amigos: Eliézer Gandra, Heloísa Antunes, Ana Krolow, Charli Lüdtkke, Luciano Lucchetta e Márcio Zanuzo, os quais demonstraram muita disposição em cooperar com a realização deste trabalho.

Aos estagiários, laboratoristas e colegas de mestrado do DCTA, pela colaboração.

Ao CNPq, pelo financiamento da bolsa de estudos.

À minha querida esposa Ana, que com amor, compreensão e dedicação, foi incentivadora para o ingresso na pós-graduação.

Aos meus pais e irmãos, pelo exemplo de coragem e luta, alento para o estudo e esperança para o futuro. A realização desta conquista é tão vossa quanto minha.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho, aqui não mencionados, mas não esquecidos.

A Deus, por ter-me concedido a vida, pelo refúgio nas horas difíceis e fonte de sabedoria para a elaboração desse trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMO	XII
SUMMARY	XIII
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 MATÉRIA-PRIMA	17
2.2 SURIMI	18
2.3 FORMAÇÃO DO GEL DE <i>SURIMI</i>	20
2.4 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	21
2.5 INIBIDORES DE PROTEASES	26
3 MATERIAL e MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAL.....	31
3.1.1 Matéria-prima.....	31
3.1.2 Insumos e reagentes	31
3.1.3 Infra-estrutura	32
3.1.3.1 Instalações.....	32
3.1.3.2 Equipamentos	32
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Processamento do <i>surimi</i>	33
3.2.2 Preparo dos géis <i>Kamaboko</i>	36
3.2.3 Metodologia analítica.....	38
3.2.3.1 Caracterização física	38
3.2.3.1.1 Força de gel	38
3.2.3.1.2 Compressão e Coesividade	38
3.2.3.2 Determinações químicas	39
3.2.3.2.1 Umidade.....	39
3.2.3.2.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar	39
3.2.3.2.3 Eletroforese SDS-PAGE.....	40
3.2.3.3 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Características físico-químicas do gel <i>kamaboko</i> de pescada-foguete.....	41
4.1.1 Influência dos tratamentos na força de gel	42
4.1.2 Influência dos inibidores BSA e clara de ovo.....	48

4.1.3	Influência do NH ₄ Cl como inibidor da transglutaminase	50
4.1.4	Influência da umidade.....	51
4.1.5	Influência da concentração de sal nos géis <i>kamaboko</i>	53
4.1.6	Influência da integridade protéica	54
4.1.7	Eletroforese SDS-PAGE	57
5	CONCLUSÕES	61
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Principais países europeus importadores de produtos a base de <i>surimi</i> (1000 t).....	19
Tabela 02. Formulações para o <i>surimi</i> de sub-produtos da pescada-foguete (<i>Macrodon ancylodon</i>).	36
Tabela 03. Formas de aquecimento para obtenção dos géis <i>kamaboko</i>	37
Tabela 04. Parâmetros físico-químicos dos géis <i>kamaboko</i> da pescada-foguete (<i>Macrodon ancylodon</i>), segundo diferentes tratamentos.	42
Tabela 05. Valores de umidade no <i>surimi</i> ¹ de pescada-foguete (<i>Macrodon Ancylodon</i>).....	51
Tabela 06. Índice de Fragmentação Miofibrilar para o <i>surimi</i> e <i>kamaboko</i> *	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01. Fluxograma para o processamento tecnológico de *surimi* de sub-
produtos da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).....34
- FIGURA 02. Fluxograma de operações para obtenção dos géis *kamaboko* de
surimi de sub-produtos da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).....37
- FIGURA 03. Caracterização da força de gel (g), de géis *kamaboko* de
pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), para o ensaio de
firmeza, em relação aos diferentes tratamentos.43
- FIGURA 04. Força de compressão (g) de géis de *surimi* de pescada-foguete
(*Macrodon ancylodon*) em relação aos diferentes tratamentos.....45
- FIGURA 05. Caracterização da coesividade de géis de *surimi* de pescada-
foguete (*Macrodon ancylodon*) frente aos diferentes tratamentos.47
- FIGURA 06. Caracterização da força de compressão (g) de géis de *surimi* de
pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*) nos diferentes
tratamentos.48
- FIGURA 07. Interação dos tratamentos na umidade de géis *kamaboko* de
pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).....52
- FIGURA 08. Influência da umidade e do tratamento térmico na força de
compressão (g) dos géis de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).....53
- FIGURA 09. Interação dos tratamentos no índice de fragmentação miofibrilar
em géis *kamaboko* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).....56

FIGURA 10. Gel 10% mostrando o efeito da BSA sobre os géis *kamaboko*: aplicação de 40 µg de proteína. S1: controle; S2: BSA; S3: BSA e combinação de sais. (a): 90° C, 15min; (b): 90° C, 30min; (c): 60° C seguido de 90° C, 15min.....57

FIGURA 11. Gel 10% mostrando o efeito da clara de ovo sobre os géis *kamaboko*: aplicação de 40 µg de proteína. S4: clara de ovo; S5: clara de ovo e combinação de sais; (a): 90° C, 15min; (b): 90° C, 30min; (c): 60° C seguido de 90° C, 15min.....57

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**AUTOR: Cláudio Rafael Kuhn, Engenheiro de Alimentos.****TÍTULO: INIBIDORES DE PROTEASES NA QUALIDADE DO GEL DE *SURIMI* DE
SUB-PRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADA-FOGUETE
(*MACRODON ANCYLODON*)****ORIENTADOR: Prof. PhD. Germano Jorge Dorneles Soares****CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández****CO-ORIENTADOR: Dr. João Luiz da Silva Vendruscolo****Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial DCTA-FAEM-UFPeI****Fevereiro de 2003**

RESUMO

A qualidade do gel de *surimi* depende da integridade da estrutura da proteína miofibrilar. A estrutura protéica pode sofrer ação de proteases neutras e termoestáveis, durante o tratamento térmico, causando o enfraquecimento do gel. O objetivo do trabalho foi controlar essa desnaturação, adicionando inibidores de proteases BSA e clara de ovo, sob diferentes condições de processamento, em géis de *surimi* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*). Através de análises de força de gel envolvendo firmeza, compressão e coesividade, obtidos instrumentalmente e do índice de fragmentação miofibrilar (IFM) e da eletroforese SDS-PAGE, avalia-se a atuação dos inibidores nos diferentes tratamentos: 5 formulações, incluindo o uso de sais (NaCl, NH₄Cl) e 3 condições de aquecimento para formar o gel *kamaboko*. Resultados indicam que todos os géis contendo inibidores apresentam força de gel significativamente maior ($P < 0,05$) que o controle. Pela maior intensidade da banda protéica na eletroforese SDS-PAGE nos géis estudados com umidade entre 72 e 74%, baixo IFM (<21) e concentração salina de 2,7%, demonstra-se que o inibidor BSA foi melhor do que a clara de ovo. Não se observou uma atividade proteolítica acentuada no gel de *surimi* controle (sem inibidor). No entanto, pode-se constatar pela intensidade da banda da miosina na eletroforese, quando se utiliza o inibidor, principalmente o BSA, uma ação protetora dos mesmos sobre a estrutura protéica, aumentando a força de gel.

Palavras-chave: *surimi*, força de gel, proteases, inibidores, processamento térmico.

DISSERTATION**AUTHOR: Claudio Rafael Kuhn, Food Engineer****TITLE: PROTEASE INHIBITORS ON SURIMI GEL QUALITY FROM BY-PRODUCTS OF KING WEAKFISH (*Macrodon ancylodon*) PROCESSING.****ADVISOR: Prof. PhD. Germano Jorge Dorneles Soares****CO-ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández****CO-ADVISOR: Dr. João Luiz da Silva Vendruscolo****Department of Food Science and Technology - DCTA-FAEM-UFPeI****February 2003**

SUMMARY

The quality of the *surimi* gel depends on the integrity of the myofibril protein structure. The structure could be lost during the heating process by a denaturation phenomenon, which is caused by neutral and heat stable proteases and consequently forming a pour gel. The objective of the work was to control the denaturation intensity using BSA and egg white as protease inhibitors, under different processing conditions, in gels of King weakfish (*Macrodon ancylodon*) *surimi*. The analysis of gel strength, that involve tests of firmness, compressibility and cohesiveness by instrumental methods, and the myofibril fragmentation index (MFI) and SDS-PAGE electrophoresis were used for evaluating the inhibitors performance in different treatments: 5 formulations, including the use of salts (NaCl, NH₄Cl) and 3 heating conditions for *kamaboko* gel formation. Results indicate that all gels with inhibitors presented significantly ($P < 0,05$) more gel strength than the control. The bigger intensity of protein band, in the electrophoresis SDS-PAGE in the gels studied with humidity between 72 and 74%, low MFI (< 21) and salt concentration of 2,7%, was demonstrated that the inhibitor BSA was better than the egg white. No remarkable proteolytic activity was observed in the *surimi* gel control (without inhibitors). However, it is possible to be noted an intensity of myosin electrophoresis band, when the inhibitors are used, mainly BSA, that acts in protecting protein structure, increasing gel strength.

Key words: *surimi*, gel strength, protease and inhibitor, heating process.

1 INTRODUÇÃO

O declínio nos estoques de peixes tradicionais de origem marinha, associado ao aumento da demanda mundial de produtos de origem animal, tem contribuído para o desenvolvimento de técnicas para o melhor aproveitamento dos recursos hídricos, inclusive nas reservas de água doce.

A carne de pescado mecanicamente separada (CPMS) constitui uma boa técnica para utilização do pescado em países ocidentais, apresentando maior flexibilidade de processamento e maior rendimento na obtenção de carne comestível do que pelo processo tradicional de filetagem. Tal processo permite um aproveitamento racional do pescado, otimizando os recursos pesqueiros. Trata-se de evitar desperdícios e disponibilizar uma fonte de proteína de origem animal, que segundo a FAO, é a proteína mais consumida no mundo (15-20Kg percapita), podendo-se utilizar desde o descarte da filetagem, até espécies que possuem baixo valor comercial. Isto permite aumentar a disponibilidade de produtos pesqueiros, sem aumentar a captura de pescado (KUHN e PRENTICE, 1999).

O *surimi* é uma base protéica de pescado de alta qualidade e funcionalidade, obtido a partir da CPMS e resultado de um processo tecnológico de lavagens e congelamento. É a matéria-prima empregada para produzir o que durante séculos foi

elaborado no Japão como produtos tipo *kamaboko*, que são géis termoestáveis formados pelo aquecimento do *surimi* (SUZUKI, 1987).

Os produtos a base de *surimi* e derivados possibilitam uma infinidade de aplicações, desde a sua utilização em produtos com alto valor agregado, como análogos presentes na fina culinária, até produtos mais simples, que atendam à necessidade social de demanda por proteína de origem animal de primeira qualidade. Além disso, pela sua funcionalidade pode ser empregado como aditivo em diversos produtos para uma melhor textura (TEJADA, 1991).

A preocupação dos pesquisadores centra-se num dos maiores problemas enfrentados na produção de *surimi* e derivados: evitar a desnaturação das proteínas miofibrilares durante o processamento do gel termoestável, haja vista serem estas proteínas as responsáveis pelas suas propriedades texturais. Proteases neutras e termoestáveis podem atuar nesta fase de processamento, ocasionando a quebra da estrutura protéica altamente organizada, desestruturando o gel com perdas irreparáveis na qualidade do produto (KUHN e SOARES, 2002).

A maioria dos estudos em desenvolvimento para controlar a proteólise emprega inibidores de proteases, os quais são substâncias protéicas, interferindo o mínimo possível nas propriedades sensoriais do produto e resguardando, ao máximo, a estrutura das proteínas miofibrilares. Os inibidores que atuam provavelmente sobre os grupamentos sulfidrílicos da proteína parecem ser os mais eficientes para manter a estabilidade do gel (MORRISSEY *et al.*, 1993).

Entretanto, apesar dos avanços já alcançados, há necessidade de pesquisas para avaliar melhor a resposta dos inibidores dentro do gel protéico miofibrilar, já que a atuação proteolítica difere entre as espécies, interferindo na resposta dos inibidores (AN *et al.*, 1994a; YONGSAWATDIGUL *et al.*, 1995, 2000). Não há

estudos dessa natureza no Brasil, constituindo-se num campo aberto à investigação científica para o pescado, tanto de origem marinha como de água doce.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de substâncias inibidoras de proteases albumina do soro bovino (BSA, uma fração do plasma) e clara de ovo, além de verificar a presença da transglutaminase, uma enzima que quando presente favorece a estrutura protéica, aumentando a força de gel. Foram empregados ensaios físicos (penetração, compressão e coesividade) para determinar a força de gel e análises químicas (índice de fragmentação miofibrilar e de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE), para verificar a atuação dos inibidores na proteção das proteínas responsáveis pela estrutura do gel.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATÉRIA-PRIMA

A pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), é um peixe demersal, da família *Sciaenidae*. É uma espécie da zona tropical e subtropical e distribui-se no Atlântico Ocidental, desde a Venezuela até a Argentina (KUHN e SANTOS, 1998). As maiores concentrações dessa espécie encontram-se em duas regiões:

- 1 - Norte da América do Sul: ocorre da Venezuela até o nordeste ocidental do Brasil;
- 2 - Região sul do Brasil: ocorre predominantemente no litoral do Rio Grande do Sul.

A captura da pescada-foguete, no Rio Grande do Sul, alcança a segunda posição em volume de captura no estado, na ordem de 9-11 mil toneladas, com grande parte desse sendo aproveitado para a filetagem, processo no qual o rendimento apresentado é de 40%. O resíduo, constituído pela cabeça, cauda, vísceras e espinhaço, são destinados para a fabricação de óleo e farinha de pescado, sendo esta, utilizada como ração animal, apresentando um baixo valor comercial (KUHN e SANTOS, 1998; KUHN e PRENTICE, 1999).

2.2 SURIMI

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

Trata-se de um concentrado protéico e a sua aplicação, além do aspecto nutricional, decorre principalmente das propriedades funcionais dessas proteínas. O *surimi* não é um produto final: constitui a matéria-prima para elaboração de produtos tipo *kamaboko*, bastante consumidos no Japão. Esses produtos são géis termoestáveis formados no aquecimento do *surimi*, previamente tratados com sal para solubilização de sua proteína (SUZUKI, 1987; BORDERÍAS e TEJADA, 1987; MORAIS, 1994).

Referências mencionam a utilização do *surimi* no Japão desde o século IX, contudo a sua importância e o crescimento da indústria ocorreu somente na década de 60, com a utilização de certos carboidratos para a proteção das miofibrilas, no seu estado congelado. Isso propiciou um produto final extraordinariamente estável, garantindo e ampliando o tempo de comercialização de *surimi*, que passou a não mais depender de capturas sazonais dos pescados (SUZUKI, 1987; TEJADA, 1991).

No ocidente, a produção teve início no fim 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).

Segundo estatísticas mundiais, a produção de *surimi* no Alaska vem aumentando, pois, em 1989, segundo Hamman (1990), foi de aproximadamente 140.000t, com um valor de 465,8 milhões de dólares, elevando-se para 815 milhões de dólares, em 1993. Estatísticas japonesas mencionaram que a produção de *surimi* nos Estados Unidos em 1989 atingiu a cifra de 242.000t e no Japão de 150.000t, tendo sido consumido, neste último país, aproximadamente 450.000t. Nesse total consumido 70.000t procederam dos Estados Unidos, 30.000t da Tailândia, 30.000t da Nova Zelândia e as restantes 170.000t de outros países. Também produzem *surimi* em quantidades significativas Taiwan, Austrália, China e vários países europeus, os quais ainda não dispõem de estatísticas. A Nova Zelândia estimou que a produção de 1987 foi de 250.000t (OPPFELT, 1986).

Verifica-se que os países europeus estão com uma demanda crescente de produtos a base de *surimi*, destacando-se entre estes, a França e a Espanha, com mercados consumidores na ordem de 20 e 18.000t.ano⁻¹, respectivamente (HOLMES, 1998). Na Tab. 01 demonstram-se as quantidades de importação de produtos a base de *surimi* de alguns países europeus, durante a primeira metade da década de 90.

Tabela 01. Principais países europeus importadores de produtos a base de *surimi* (1000 t).

<i>País</i>	<i>Período de importação (anos)</i>					
	1991	1992	1993	1994	1995	1996
França	13,9	13,4	14,2	18,0	19,1	17,9
Itália	4,6	5,7	6,2	8,0	8,2	9,3
Espanha	12,5	14,6	11,6	15,9	18,7	18,4
Reino Unido	5,0	5,1	3,7	6,0	5,2	7,2

Fonte: Hempel, Seafood International (1999).

No período entre 1997 e 2000, a produção de *surimi* no Japão manteve uma média de 50.000t.ano⁻¹ (GLOBEFISH DATABANK – FAO, 2000). Na Tailândia, a produção média é de 65.000 t.ano⁻¹, enquanto que nas Américas, a maior produção no ano de 1994 ficou com os Estados Unidos (209.000t); na América do Sul, a Argentina e o Chile produziram 26.000 e 4.500t, respectivamente (HEMPEL, 1999).

Atualmente, utiliza-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 à base de lagosta, caranguejo, siri, etc. A popularidade de 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 e LEE, 1992; HEMPEL, 1999).

2.3 FORMAÇÃO DO GEL DE *SURIMI*

Quando submetido a tratamento térmico sob cocção, o *surimi* forma um gel termoestável, denominado *kamaboko*. O gel tem na sua textura, uma particularidade que o diferencia dos géis formados com outras proteínas de origem animal, pois a sua textura perceptível à mastigação é muito similar à do pescado “in natura”. Essa característica pode ser expressa em termos de força de gel, que vem a ser o principal indicador de 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*, pela solubilização das proteínas miofibrilares, as quais se hidratam e criam uma rede protéica, unida por pontes de hidrogênio, com interações hidrófobas e ligações dissulfeto. Isto tem sido associado também, com a atividade da transglutaminase, uma enzima endógena na carne de pescado. As transglutaminases podem formar ligações do tipo ϵ -(γ -glutamyl)lys e tornar possível os cruzamentos de várias proteínas, alterando a textura do *suwari* no processamento

(SAKAMOTO *et al.*, 1995). A transglutaminase é cálcio-dependente, tendo como subproduto de sua reação, a formação de amônia. Desta maneira, será possível inibir a ação da transglutaminase com a utilização de agentes quelantes de cálcio, como EDTA, ou de sais do tipo NH_4Cl , que possam gerar uma grande quantidade de amônia (KUMAZAWA *et al.*, 1995; SAKAMOTO *et al.*, 1995).

Ao aumentar lentamente a temperatura do gel até 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 hidrófobas (BORDERÍAS e TEJADA, 1987; YONGSAWATDIGUL *et al.*, 1995).

O mecanismo de formação do gel ocorre em dois estágios. Um, envolvendo o desdobramento inicial da proteína e outro, a sua agregação. O aquecimento da molécula protéica enfraquece as ligações que mantêm as estruturas secundárias e terciárias. Com a ocorrência da 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. O aumento da viscosidade nas redes tridimensionais mais fracas possibilitará uma fluidez na estrutura e o gel verdadeiro não se formará. Por outro lado, as fortes interações entre as moléculas da proteína produzem um colapso na rede e a água será expelida da estrutura. Um balanço entre forças repulsivas e atrativas é, portanto, importante para a formação adequada da estrutura do gel (KUHN e SOARES, 2002).

2.4 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

No músculo de pescado, como em outros tecidos, ocorrem numerosas enzimas proteolíticas, todas próximas, constituindo um sistema altamente

organizado e complexo. Durante a extração das proteínas miofibrilares para a obtenção do *surimi*, muito dessa organização é perdida, ocasionando modificações autolíticas *post mortem* no músculo de pescado, principalmente no posterior processamento (STOKNES e RUSTAD, 1995).

As miofibrilas são suscetíveis à autólise por ação das proteases 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; NIWA, 1992).

O componente mais importante a contribuir na formação do gel de *surimi* é a miosina, pois a sua presença e concentração são determinantes na força do gel. Diversas proteases estão envolvidas na degradação do músculo de pescado, sendo as alcalinas apontadas como os principais agentes de tal desnaturação. Entretanto, existem outras proteases, como a catepsina-L, que tem alta afinidade pela miosina e não é completamente removida pelo processo de lavagem na elaboração do *surimi*. (AN *et al.*, 1994a, 1994b, 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, hidrófobas e pontes dissulfeto (JARENBACK e 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 tem 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*), observou-se aumento na desnaturação da miosina, o que implica numa substancial diminuição da força do gel (AN *et al.*, 1996).

A ocorrência do *modori*, pela atividade proteolítica ou pelo aquecimento da proteína, permanece como a principal causa de alteração da textura e enfraquecimento do gel de *surimi*, embora não se tenha a comprovação definitiva do fenômeno (SUZUKI, 1987; KUHN e SOARES, 2002).

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). Então, primeiro forma-se o gel de actomiosina, que posteriormente sofrerá degradação, devido a um conjunto de fatores que interferem na estrutura do gel durante o aquecimento.

Segundo Morrissey *et al.* (1993), há desaparecimento da meromiosina pesada 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 a 62° C, depende exclusivamente da hidrólise da proteína, através da ação proteolítica.

Makinodan *et al.* (1963), descreveram 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 ótima atividade 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

pescado, 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 músculo de vários pescados de água doce e salgada.

A importância da protease cisteína na textura do gel é devido a sua termoestabilidade e habilidade para clivar ligações peptídicas internas, produzindo cadeias peptídicas mais curtas, enquanto as exopeptidases somente podem clivar ligações peptídicas terminais (AN *et al.*, 1996). Para Yamashita e Konagaya (1990, 1991a, 1991b), 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, ocorrida 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.*, 1994b; MORRISSEY *et al.*, 1993).

A atividade das enzimas proteolíticas difere entre as espécies ou até na mesma espécie de pescado, como por exemplo, as diferenças entre as proteases do tubo digestivo do salmão do Atlântico (TORRISSEN e 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, proteases neutras e enzimas digestivas, como a 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 que 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 (AN *et al.*, 1996; BOYE e LANIER, 1988; NOMATA *et al.*, 1985; TOYOHARA *et al.*, 1987; WASSON, 1992; YANAGIHARA *et al.*, 1991).

A protease alcalina atua não só em substratos exógenos, mas na proteína miofibrilar isolada (MAKINODAN e IKEDA, 1971; LIN e LANIER, 1980). A protease alcalina 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 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 e RUSTAD, 1995).

Stoknes *et al.* (1993) constataram que a protease alcalina de músculo de salmão é mais estável, nas temperaturas mais altas, do que a extraída do músculo de arenque (*Clupea arenagus*). Para vários autores (MAKINODAN e 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, seja por aquecimento, adição de uréia ou radiação gama *in vitro*. A protease alcalina presente na corvina (*Argyrosomus argentatus*) e salmão-cão (*Oncohynchus keta*) atingiu uma atividade ótima na faixa de 65°C e foi mais estável ao calor no salmão do que na corvina. Diferenças na sensibilidade ao aquecimento podem refletir diferenças nas condições de vida do peixe, tais como temperatura da água e salinidade. Salmão do Atlântico e truta arco-íris, pertencentes à família Salmonidae, adaptam-se à salinidade e temperatura da água (TOYOHARA *et al.*, 1987).

2.5 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, com a água retida dentro da estrutura (KUHN e SOARES, 2002).

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

Produtos à 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

proteínases e sua estabilidade ao aquecimento, evitando a clivagem das proteínas do músculo (AN *et al.*, 1996; CHANG-LEE *et al.*, 1989; MORRISSEY *et al.*, 1993).

A protease, inibida no congelamento, pode ativar-se no momento da elaboração dos produtos à base de *surimi*, pelo aumento da temperatura. A sua degradação sobre o gel, dependente de temperatura, foi demonstrada, previamente, no *surimi* preparado a partir 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 na obtenção da carne de pescado mecanicamente separada (SU *et al.*, 1981), ou ainda, por infestações de parasitas como *Myxosporidian* spp, conhecida por produzir 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 nos músculos do pescado, segundo as diferentes espécies, ou seja, há diferença na velocidade de autólise, conseqüentemente, podem 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, provavelmente, os mais ativos inibidores (KUHN e SOARES, 2002). 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 argentinensis*), 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 (clara de ovo, extrato de batata, proteínas do soro do leite), 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. Essas vantagens transformam o PPB num inibidor potencialmente eficiente (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, as quais 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 estabilizam a proteína e aumentam a temperatura de desnaturação da albumina de soro (PETERS, 1985). A albumina é uma proteína hidrófoba, com uma estrutura flexível e tem alta afinidade por interfaces ar/água (KATO *et al.*, 1986).

No plasma bovino, a γ -globulina foi a mais estável, requerendo uma temperatura maior para desnaturar-se. As α -globulinas contém cerca de 20 glicoproteínas e a quantidade de modificações de carboidratos de proteína para proteína, alcança até 40% ou mais por peso. A boa estabilidade da espuma da α -globulina pode ser atribuída a seu alto conteúdo em carboidratos, que pode aumentar a viscosidade da lâmina e retardar sua drenagem (RAEKER e JOHNSON, 1995).

A clara de ovo, um inibidor bastante eficaz, possui uma propriedade funcional importante, onde a ovoalbumina, seu principal componente, tem a temperatura de desnaturação coincidente com a temperatura de gelatinização do amido, um produto utilizado como ingrediente em vários produtos à base de *surimi*. Isso ocasiona um aumento na viscosidade do produto, prevenindo a coalescência de células de ar e fixando a estrutura interna, o que possibilita alcançar um máximo de volume antes da fixação pelo calor. Ao lado destas propriedades, a capacidade espumante e de emulsificação da clara de ovo contribuem para estabilização das emulsões, destacando-se as globulinas (SHEPHERD e YOEL, 1976; DONOVAN, 1977; RAEKER e JOHNSON, 1995).

A ovoalbumina pode ser convertida para S-ovoalbumina, a forma mais estável, apresentando uma temperatura de desnaturação 8° C maior do que a ovoalbumina (DONOVAN e MAPES, 1976), em ovos armazenados sob um período prolongado. Sempre que esses forem utilizados, há demora na desnaturação da proteína, 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 pode ainda propiciar odores indesejáveis, em níveis requeridos para inibição das proteases do *surimi* (PORTER *et al.*, 1993).

Na clara de ovo, a proteína onde se encontra a atividade inibitória sobre a proteólise é a ovostatina, relatada por Weerasinghe *et al.* (1996b), como homóloga à α_2 -M, seja na sua estrutura molecular, função ou mecanismo de inibição.

Segundo Ashie e Simpson (1996), a α_2 -M presente tanto nas proteínas do plasma bovino como na clara de ovo, inibiu de modo não competitivo as proteases catepsina-D, tripsina, quimiotripsina e colagenase, controlando a atividade destas e outras enzimas. Entretanto, em tecidos intactos ou em outros alimentos à base de músculo, a sua atuação pode ser limitada, pela restrita penetração no tecido, devido a barreiras de membranas e pelo seu próprio tamanho molecular. As proteases podem ser relativamente inibidas no *surimi* e outros músculos picados, pela α_2 -M. Além disso, sua atividade não pareceu afetada pela baixa temperatura (4-7° C), freqüentemente encontradas na estocagem de alimentos musculares, assegurando controle contínuo das proteases, mesmo durante esse período.

O extrato de batata, não mostra quaisquer limitações sensoriais como inibidor, mas causa problema de perda na cor do *surimi* (REPPOND *et al.*, 1995). Diversos pesquisadores (AKAZAWA *et al.*, 1993; CHANG-LEE *et al.*, 1990; PIYACHOMKWAN e PENNER, 1995; RYDER, 1991) propuseram o soro de leite concentrado para enriquecer a força de gel do *surimi*, em altos níveis, sem que nenhuma propriedade sensorial negativa fosse relatada.

Os principais constituintes do soro de leite concentrado são: a β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e soralbumina; sendo a β -lactoglobulina o principal componente presente e a 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 (RAEKER e JOHNSON, 1995).

Pesquisas realizadas no *surimi* de merluza comum (*Merluccius argentinensis*), utilizando soro de leite concentrado, apontaram para uma concentração mínima de 3%, para tais proteínas poderem ser utilizadas como inibidoras de protease, produzindo assim um *surimi* com uma força de gel equivalente aos géis contendo proteínas do plasma bovino a 1% (WEERASINGHE *et al.*, 1996a). Neste caso, a atividade inibitória mais efetiva no *surimi* de merluza comum foi sobre a protease de cisteína, a qual apresenta resíduos no sítio ativo da protease (SEYMOUR *et al.*, 1994).

Por outro lado, 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.* (1996a), as proteínas do plasma bovino a uma concentração de 1%, alcançaram maior eficiência quando comparadas com o concentrado de proteínas do soro de leite, no enriquecimento da força de gel do *surimi* de merluza do Pacífico (*Merluccius productus*). A variação de resultados aponta a necessidade de pesquisa, tanto nestes, quanto em novos inibidores de protease, para aplicação em produtos à base de *surimi* (AKAZAWA *et al.*, 1993).

3 MATERIAL e MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matéria-prima

A matéria-prima para o processamento de *surimi* foi o descarte do processo de filetagem (resíduo) da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*). A coleta foi realizada na linha de processamento da indústria Torquato Pontes Pescados Ltda. e a obtenção da carne de pescado mecanicamente separada (CPMS) ocorreu na indústria pesqueira Furtado S/A, localizadas na cidade de Rio Grande, RS.

3.1.2 Insumos e reagentes

O material empregado na obtenção de *surimi* e *kamaboko* envolveu os seguintes reagentes:

- a. NaCl (Casa da Química Ind. e Com., São Paulo);
- b. Tripolifosfato de Sódio (LabSynth Produtos para Laboratório);
- c. Sorbitol (LabSynth Produtos para Laboratório);
- d. Peróxido de Hidrogênio (LabSynth Produtos para Laboratório);
- e. Albumina de Soro Bovino, BSA, fraction V (Sigma Chemical CO);
- f. Clara de ovo (Acros Organics);
- g. Amido, fécula de mandioca (LabSynth Produtos para Laboratório);

- h. NH_4Cl (Vetec Química Fina Ltda);
- i. Marcador padrão de proteína BenchMark Protein Ladder (Invitrogen ref. 10747-012).

3.1.3 Infra-estrutura

3.1.3.1 Instalações

- a. Planta de processamento das indústrias: Torquato Pontes Pescados Ltda., e Furtado S/A, situadas na cidade de Rio Grande – RS;
- b. Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, em Rio Grande – RS;
- c. Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Universidade Federal de Pelotas, dentre eles: Laboratório de Análises Bromatológicas e Bioquímicas, Laboratório de Biotecnologia de Alimentos e Laboratório de Controle de Poluição;
- d. Laboratórios do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas;
- e. Laboratório da Indústria de Alimentos da Embrapa – Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado - CPACT, Pelotas – RS.
- f. Centro de Genômica, do Departamento de Fitotecnia da UFPel.

3.1.3.2 Equipamentos

- a. Despolpadeira Baader, mod. 694 (Indústria Furtado);
- b. Prensa, refiner, freezer horizontal (Laboratório de Tecnologia de Alimentos, DQ/FURG);
- c. Espectrofotômetro Micronal, B442 (Laboratório de Controle de Poluição), Agitador Kline, Fonte para Eletroforese Life Technologies Model 250, Mini-V 8-10 (Lab. Biotecnologia de Alimentos - DCTA/UFPel), Agitador Turrax, (Lab. Análises Bromatológicas e Bioquímicas - DCTA/UFPel);
- d. Máquina Universal de Teste Instron, Mod. 1130, Instron Corp. Canton, MA (Embrapa - CPACT);

- e. Centrífuga refrigerada Sorvall – RC5C Refrigerated Superspeed Centrifuge, Sorvall Equipaments, Du Pont Instruments, Newtown, CT (Centro de Biotecnologia – UFPel);
- f. Centrífuga Eppendorf 5810R (Centro de Genômica, Departamento de Fitotecnia, UFPel).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Processamento do *surimi*

A seqüência de operações necessárias para o processamento do *surimi* elaborado a partir de sub-produtos do processamento da pescada, pode ser observada na Fig. 01 e seguiu o modelo proposto por Kuhn e Prentice (1999) e Kuhn e Santos (1998).

A obtenção da matéria-prima, com seu tratamento inicial até a separação mecânica, ocorreu na indústria Torquato Pontes Pescados Ltda. O processo de separação mecânica da carne, utilizando a separadora Baader, modelo 694, foi realizado na indústria pesqueira Furtado S/A. A seqüência de operações após estas etapas foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Química, na Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG.

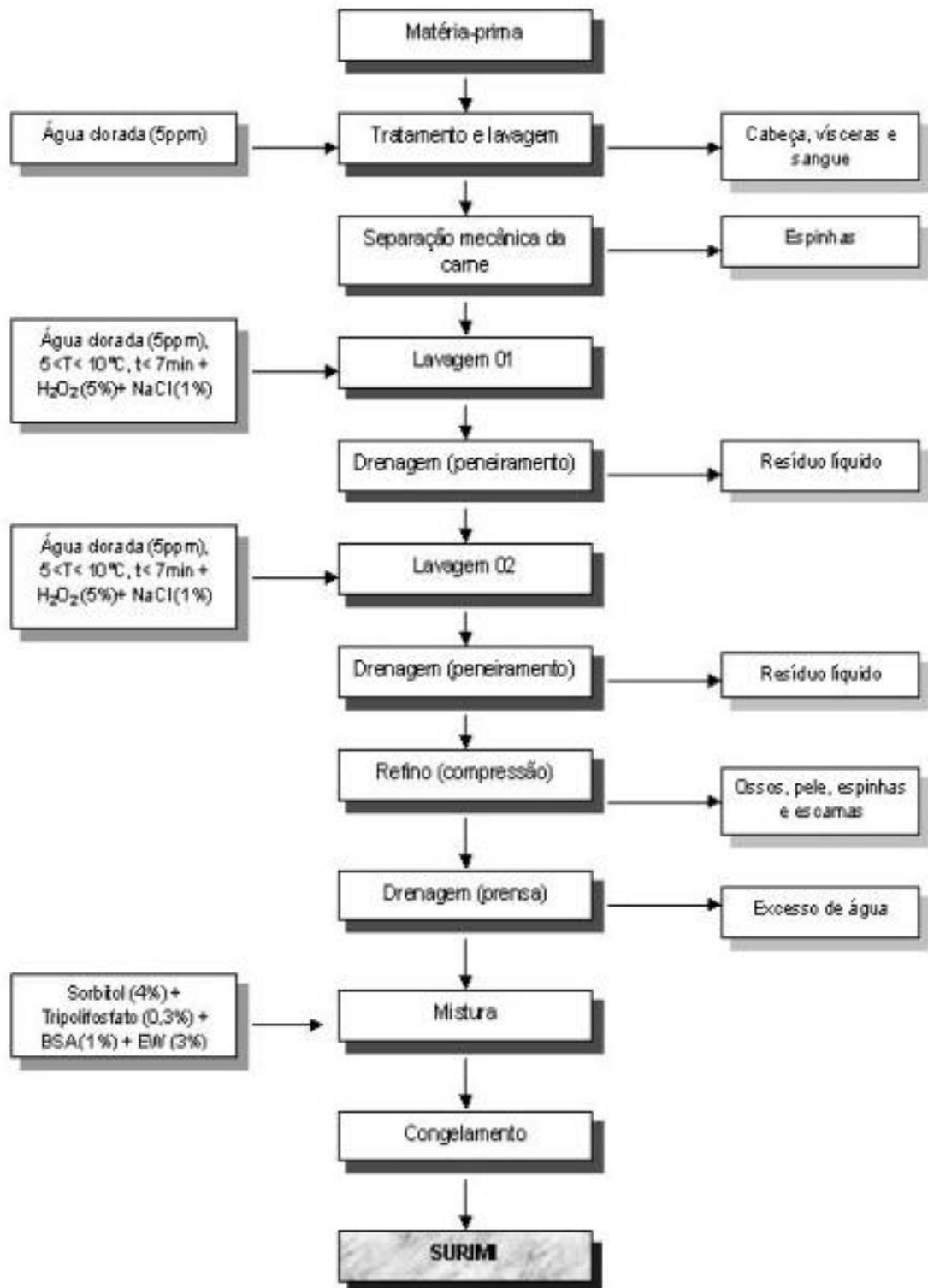


FIGURA 01. Fluxograma para o processamento tecnológico de *surimi* de sub-produtos da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

Os espinhaços da pescada-foguete, provenientes da linha de processamento da filetagem, foram submetidos ao tratamento inicial, com a remoção da cabeça, restos de vísceras e sangue, seguido de lavagem em água clorada (5ppm) para retirar sujidades e diminuir a contaminação microbiana.

Para obtenção da CPMS, se utilizou uma separadora mecânica de carne, despoldadeira Baader modelo 694. O processo consistiu em uma compressão mecânica dos espinhaços sobre um cilindro perfurado com 5mm de diâmetro, permitindo separar a carne das espinhas, pele e escamas. A polpa foi retirada pelo movimento rotatório do cilindro, que contém em seu interior um parafuso de rosca sem-fim. O rendimento da operação depende da pressão aplicada sobre a matéria-prima, de sua qualidade e do tamanho das perfurações do cilindro.

O ciclo de lavagens constituiu-se de duas lavagens da polpa, utilizando-se em cada lavagem uma relação entre polpa e água de 3:1 (p/v), à temperatura de trabalho entre 5-10° C, por um tempo de 5-7min e concentrações de 1% de cloreto de sódio (NaCl) e 5% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Entre cada lavagem foi realizada uma drenagem (peneiramento), para remoção do excesso de água e preparo da polpa para a lavagem seguinte.

Após o peneiramento decorrente da segunda lavagem, teve início a fase de refino, com o objetivo de retirar fragmentos indesejáveis, tais como pele e escamas, que porventura tivessem permanecido junto à polpa. Foi adotado o refino por compressão da polpa em um cilindro perfurado (2mm de diâmetro), ficando retidos e separados os fragmentos de espinhas, pele e escamas.

A drenagem final da polpa foi através do processo de prensagem, para a retirada do excesso de água e atingir uma umidade na faixa de 70-75%, próxima ao nível de umidade do músculo. A seguir, a polpa foi dividida em cinco porções de 500g (1 controle, 2 para *surimi* com BSA e 2 para *surimi* com clara de ovo) e

adicionados os agentes crioprotetores (sorbitol e tripolifosfato de sódio), juntamente com os inibidores BSA a 1% e clara de ovo a 3% (variáveis independentes do tratamento estatístico), com a finalidade de conservação e proteção da estrutura protéica. Aplicou-se o congelamento (-20°C) para conservação dos blocos de *surimi* e o produto foi estocado até o momento de realização das análises.

3.2.2 Preparo dos géis *Kamaboko*

Para o preparo dos géis *kamaboko*, foram utilizadas cinco diferentes formulações de *surimi*, demonstradas na Tab. 02.

Tabela 02. Formulações para o *surimi* de sub-produtos da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

TRATAMENTO [†]	INIBIDORES
SC	—
S2	BSA (1%)
S3	BSA (1%) + NH ₄ Cl (0,7%)
S4	EW (3%)
S5	EW (3%) + NH ₄ Cl (0,7%)

[†] *Surimi*: SC, controle; S2, com BSA; S3, com BSA e NH₄Cl; S4, com clara de ovo; S5, com clara de ovo e NH₄Cl.

A seqüência de operações para a obtenção dos géis *kamaboko* é demonstrada na Fig. 02 e foi baseada nos modelos propostos por Morrissey *et al.* (1993) e Sakamoto *et al.* (1995).

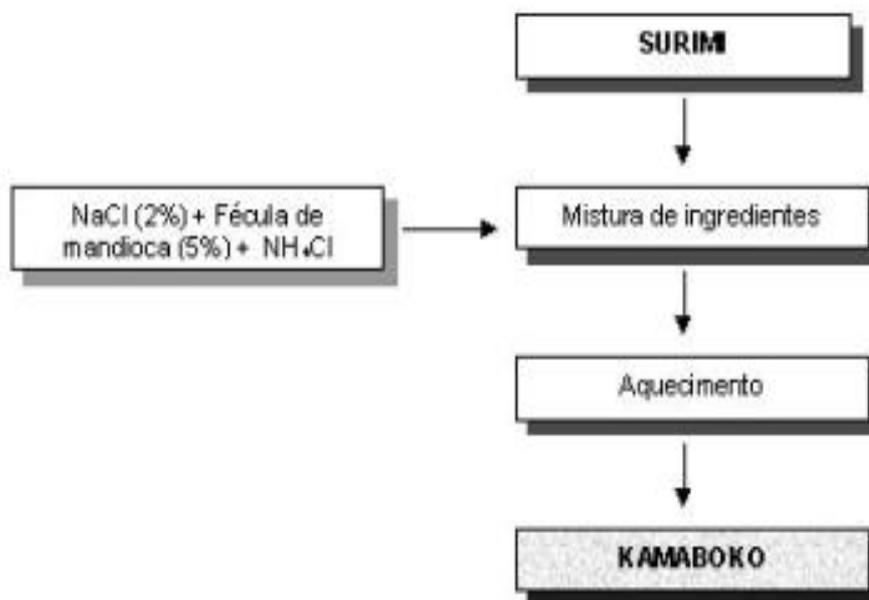


FIGURA 02. Fluxograma de operações para obtenção dos géis *kamaboko* de *surimi* de sub-produtos da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

Para o preparo dos géis, foram pesados 300g de *surimi* previamente descongelado, com os ingredientes (NaCl 2%, fécula de mandioca 5%, NH₄Cl 0,7%) adicionados e misturados (manualmente, com graal e pistilo) a cada uma das formulações (Tab. 02). Após a mistura, as amostras para cada tratamento foram colocadas em fôrmas cilíndricas com 2,5cm de altura e diâmetro, sendo então submetidas a diferentes condições de aquecimento, demonstradas na Tab. 03.

Tabela 03. Formas de aquecimento para obtenção dos géis *kamaboko*.

Aquecimento	Temperatura (° C)	Tempo (min)
A*	90	15
B	90	30
C	60 e 90	30 e 15

* Controle

3.2.3 Metodologia analítica

3.2.3.1 Caracterização física

Os ensaios físicos para avaliar a força do gel (testes de firmeza, compressão e coesividade) foram realizados na máquina de provas universal Instron, na EMBRAPA – Clima Temperado, Unidade Cascata.

3.2.3.1.1 Força de gel

A força de gel foi avaliada através de um teste pontual de penetração, utilizando a máquina Instron, calibrada com uma célula de carga de 2,0Kg, velocidades de penetração e de carta de $10\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ e com um *probe* esférico de 5mm de diâmetro, em amostras cilíndricas (altura e diâmetro de 2,5cm), com três repetições. A força é função da profundidade de penetração, a qual é determinada no momento em que o *probe* penetra totalmente na amostra, de modo a controlar a heterogeneidade local (SAKAMOTO *et al.*, 1995).

3.2.3.1.2 Compressão e Coesividade

Em um mesmo ensaio na máquina Instron, mediram-se as forças de compressão e coesividade. Para tanto, utilizou-se de uma célula de carga de 50Kg, velocidades de carta e cabeça de $10\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$, célula plana de pistão chato (35mm de diâmetro) para a dupla compressão, em amostras cilíndricas (altura e diâmetro de 2,5cm), com três repetições. A força de compressão é avaliada primeiramente até uma altura determinada experimentalmente, onde a amostra não deve perder sua forma, ou seja, não entre em colapso e rompa. As amostras suportaram uma compressão de 1/4 de sua altura (sentido axial), registrando-se graficamente a força exercida nesse momento. Para a coesividade, submeteu-se a mesma amostra a uma segunda compressão de modo separado e consecutivo, registrando-se a força de compressão. A razão das áreas obtidas (A_1 e A_2) são transformadas em

coesividade (ARÊAS e LAWRIE, 1984; BOYE e LANIER, 1988; SOARES e ARÊAS, 1995).

3.2.3.2 Determinações químicas

3.2.3.2.1 Umidade

Para análise da umidade, foi utilizado o método de secagem em estufa a $105\pm 3^{\circ}\text{C}$, com circulação natural de ar, até peso constante, em três repetições e com 5,0 gramas para cada amostra (AOAC, 1995).

3.2.3.2.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar

Amostras de *surimi* foram misturadas a um tampão fosfato (10 vol) com baixa força iônica, sendo a solução homogeneizada (Ultraturrax) e centrifugada duas vezes (5.500rpm, 20min), em centrífuga refrigerada Sorvall – RC5C (Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor SS-34, Sorvall Equipaments, Du Pont Instruments, Newtown, CT), com o sobrenadante descartado. A seguir, o precipitado foi ressuspensionado (10 vol) num segundo tampão, de força iônica elevada, sendo homogeneizado e centrifugado duas vezes, com o sobrenadante agora recolhido e identificado como proteína miofibrilar. Finalmente, determinou-se a concentração das proteínas da fração solúvel, pelo método de Biureto (CHANG-LEE *et al.*, 1990).

A fragmentação miofibrilar foi determinada a partir de uma alíquota de 10ml de extrato protéico, contendo $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteína, através da homogeneização controlada, à temperatura de 2°C , durante 20s (agitador de tubos). A fragmentação desenvolvida nessa alíquota, pela homogeneização, foi quantificada como unidades de absorvância a 540nm (Espectrofotômetro Micronal B442) e multiplicando-a pelo fator 200, denomina-se índice de fragmentação miofibrilar (DAVEY e GILBERT, 1968).

3.2.3.2.3 Eletroforese SDS-PAGE

A extração da proteína para eletroforese adotou o modelo proposto por Morrissey *et al.* (1993). Amostras de *kamaboko* finamente fatiadas foram adicionadas a uma solução de SDS 5%, pré-aquecida a 95° C, na proporção 1:9 (p/v), sendo homogeneizada (Ultraturrax) até que nenhuma partícula fosse observada. Após, a mistura foi incubada em banho-maria (80° C, 1h) para dissolver completamente a proteína miofibrilar. A amostra foi então centrifugada (17.500XG, 20', Centrífuga Eppendorf 5810R, rotor F-34-6-38 fixed angle) em temperatura ambiente e o sobrenadante coletado. A quantificação de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

Para a corrida em SDS-PAGE adotou-se a metodologia descrita segundo Laemmli (1970). Na corrida em gel, aplicaram-se 15µl da amostra, contendo aproximadamente 40µg de proteína, de acordo com Lin e Park (1996). O padrão protéico (curva de calibração) utilizado, foi o marcador padrão de proteína com proteínas de peso molecular na faixa de 220-15 kDa.

3.2.3.3 Análise estatística

O experimento foi conduzido segundo delineamento experimental inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 5x3x3 (5 formulações x 3 tipos de aquecimento x 3 repetições). A comparação de médias e a interação entre os tratamentos foram realizadas através de análises de variância aplicando-se o teste de Duncan, a 5% de significância (YATES, 1937), utilizando o software Statistica 5.0 para Windows (STATSOFT, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características físico-químicas do gel *kamaboko* de pescada-foguete

Os resultados das avaliações físico-químicas no gel *kamaboko* de pescada-foguete encontram-se na Tab. 04. Nesta, estão relacionados os valores de umidade e o índice de fragmentação miofibrilar que, juntamente com as análises de compressão, coesividade e firmeza, vão indicar a influência dos inibidores de protease sobre a força de gel. A compressão depende da capacidade de geleificação da proteína, sob aquecimento, estando relacionada a fatores como integridade e coesividade da matriz protéica; enquanto que as condições do gel, em termos de uniformidade e densidade, são mais bem avaliadas pelo teste da penetração, também denominado de firmeza.

Tabela 04. Parâmetros físico-químicos dos géis *kamaboko* da pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), segundo diferentes tratamentos.

Tratamentos*	Parâmetros físico-químicos				
	Firmeza(g)	Compressão(g)	Coesividade	Umidade(%)	IFM
S1 a	219,17 ^a	1866,67 ^c	0,7431 ^b	73,6855 ^b	15,4 ^b
S1 b	205,83 ^b	2225,00 ^c	0,7382 ^b	73,0579 ^c	15,7 ^b
S1 c	234,75 ^a	2116,67 ^c	0,8038 ^a	73,4982 ^c	17,1 ^b
S2 a	199,37 ^b	2255,00 ^b	0,8205 ^a	73,7852 ^a	17,2 ^b
S2 b	216,36 ^b	2433,00 ^b	0,7018 ^c	73,1054 ^c	18,2 ^b
S2 c	206,25 ^b	2751,67 ^b	0,7728 ^b	74,0011 ^a	16,2 ^b
S3 a	202,00 ^b	3208,33 ^a	0,7899 ^a	73,1220 ^c	13,2 ^c
S3 b	209,37 ^b	3026,67 ^a	0,7420 ^b	73,2972 ^c	18,0 ^a
S3 c	206,07 ^b	2866,67 ^a	0,7866 ^a	73,3890 ^c	20,8 ^a
S4 a	205,31 ^b	2325,00 ^b	0,8128 ^a	73,0309 ^c	14,1 ^c
S4 b	206,36 ^b	2515,00 ^b	0,6698 ^c	72,9359 ^c	16,7 ^b
S4 c	209,42 ^b	2620,00 ^b	0,7847 ^a	72,4717 ^b	17,2 ^b
S5 a	179,00 ^c	2483,33 ^b	0,7992 ^a	74,4514 ^a	19,2 ^a
S5 b	199,09 ^c	2446,67 ^b	0,8211 ^a	73,4734 ^c	15,6 ^c
S5 c	195,92 ^c	2533,33 ^b	0,8339 ^a	74,2809 ^a	17,4 ^b

*(S1) controle; (S2) *surimi* com BSA; (S3) *surimi* com BSA e NH₄Cl; (S4) *surimi* com clara de ovo; (S5) *surimi* com clara de ovo e NH₄Cl; (a) 90° C, 15min; (b) 90° C, 30min; (c) 60°, 30min + 90° C, 15min. IFM: índice de fragmentação miofibrilar. Letras diferentes nas colunas denotam diferença no teste de Duncan com 5% de probabilidade de erro.

4.1.1 Influência dos tratamentos na força de gel

Os resultados do teste de Duncan, para o ensaio de firmeza, apontaram uma influência dos tratamentos sobre a força de gel. Neste teste, a menor resistência dos géis apontou para o tratamento S5, com a presença do inibidor clara de ovo e da combinação de sais em todas as formas de aquecimento, com diferença significativa ($P < 0,05$), em relação ao controle, que apresentou os melhores resultados para os tratamentos S1a e S1c, em relação aos demais. Para os tratamentos com os

inibidores BSA (S2, S3) e clara de ovo (S4), não houve diferença significativa quando comparados entre si. Uma melhor visualização desses resultados é apresentada na Fig. 03.

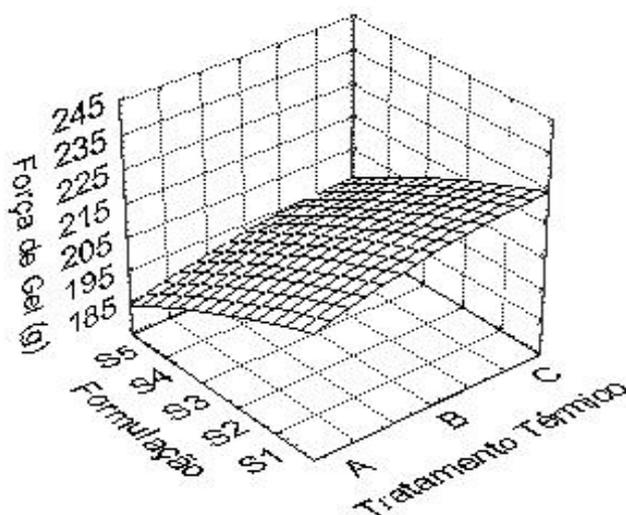


FIGURA 03. Caracterização da força de gel (g), de géis *kamaboko* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*), para o ensaio de firmeza, em relação aos diferentes tratamentos.

A maior força de gel das amostras controle em relação àquelas contendo inibidores, para o teste de firmeza, contrariou o esperado, pois diversos autores (MORRISSEY *et al.*, 1993; REPPOND e BABBITT, 1993; WEERASINGHE *et al.*, 1996a; SEYMOUR *et al.*, 1997) relatam que em outras espécies já estudadas, a tendência foi de que a presença de inibidores e aditivos resultou em aumentos na força de gel. No entanto, esse comportamento pode ser explicado pela maneira como os géis foram preparados. A forma manual seja na mistura dos ingredientes, utilizando graal e pistilo, como no modo de acondicionamento para cocção e congelamento, juntamente com a dificuldade apresentada para acomodação da amostra de *surimi* dentro do tubo para a cocção, que resultou em uma compactação irregular. Isso somente foi evidenciado na retirada do gel dos tubos, ao término do aquecimento, onde pequenos e difusos espaços na superfície da amostra denunciaram a presença de ar. Como o teste de penetração é um teste pontual, isto é, somente uma região da seção transversal é submetida à penetração, as variações na densidade da matriz e qualquer defeito ou a não homogeneidade, como bolsas de ar e ingredientes adicionados, pode alterar a força necessária à penetração,

influenciando os resultados. Assim, a resposta obtida pode não ser representativa do todo, sendo menos sensível para a discriminação entre os diferentes tratamentos.

Isto também foi observado por Lee e Chung (1989), confirmando que os testes de penetração não são ideais para descrever as características do gel de *surimi* das diferentes espécies, pois dependem muito das condições de processamento. Barreto e Beirão (1999), estudando as propriedades texturais do *surimi* de tilápia (*Oreochromis* spp), em condições de processamento iguais ao do presente experimento, citam as mesmas dificuldades, onde as curvas de penetração apresentaram vários picos. Diferentes modos de preparo da massa de *surimi* foram testados por Babbitt e Reppond (1988), entre os quais, o uso de vácuo na mistura dos ingredientes e no momento da embalagem. Amostras embaladas a vácuo aumentam a densidade dos géis, gerando mais força, independente do tipo de misturador utilizado. Sem a presença de vácuo, o tipo de misturador utilizado sempre apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) nos resultados para o ensaio de firmeza dos géis.

Contudo, a integridade estrutural da proteína também está relacionada com a resistência à compressão e coesividade (LEE e CHUNG, 1989). O comportamento da compressão obtida para o gel de *surimi* de pescada-foguete, pode ser observado na Fig. 04.

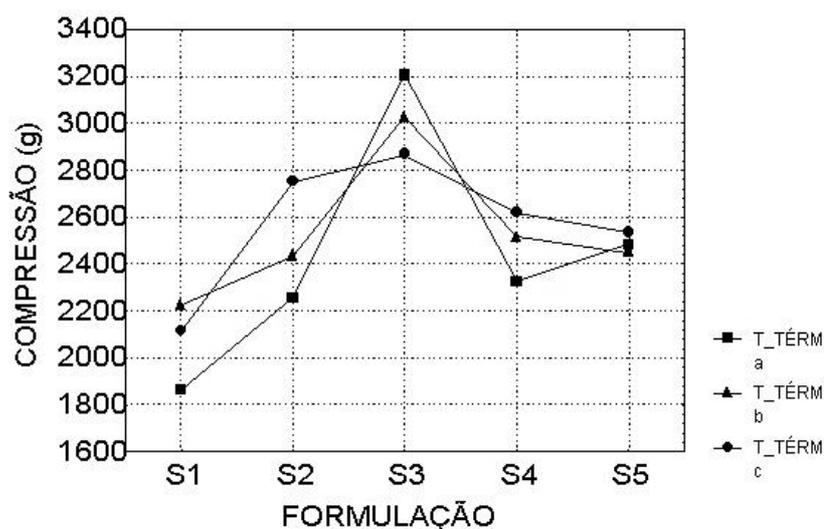


FIGURA 04. Força de compressão (g) de géis de *surimi* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*) em relação aos diferentes tratamentos.

O gel de *surimi* de pescada-foguete, mesmo sem a utilização de inibidores, teve uma força de compressão média (2,0Kg), maior que a do *surimi* de tilápia (1,0Kg), estudada por Barreto e Beirão (1999). Boye e Lanier (1988), estudando o gel de xixarro do Atlântico (*Brevoortia tyrannus*), encontraram igualmente uma média de 2,0Kg para a força de compressão, em géis sem inibidores e processamento térmico similar.

Através do teste de compressão foi possível observar as diferenças de comportamento do gel de *surimi* de pescada entre os diferentes tratamentos. A formulação apresentou influência significativa ($P < 0,05$) na força de compressão, em relação ao controle, independente do tratamento térmico aplicado sobre o *surimi*. O gel *kamaboko* contendo BSA e NH_4Cl (S3) apresentou o melhor resultado para este teste, suportando mais de 3,0 Kg de compressão. As amostras contendo BSA e clara de ovo, com e sem NH_4Cl , embora significativamente melhores ($P < 0,05$) em relação ao controle, não apresentaram diferença entre si, sendo inferiores ao tratamento S3.

Pode-se afirmar que os ensaios de compressão não exigem preparação especial da amostra, a não ser, sua uniformidade geométrica para uma consistente resposta à força de deformação, dentro de um mesmo grupo de amostras. Essa uniformidade poderia ser alcançada com um gel cilíndrico, com um corte em sua seção transversal, formando um ângulo reto. Comprimindo-se a amostra no sentido axial (1/4 da sua altura) a resistência à compressão pode ser obtida experimentalmente, atingindo-se a máxima força no ponto em que a estrutura cilíndrica não se rompa, mesmo quando a superfície inteira de contato estiver submetida à carga, o que refletiria, sem dúvida, um melhor comportamento da estrutura do gel.

A influência dos tratamentos térmicos sobre a variável coesividade observada na Fig. 05 foi bastante significativa. Os aquecimentos, a 90° por 15min e em dois estágios (60° C, 30min seguido de 90° C, 15min), foram os mais adequados para obtenção da maior coesividade em géis *kamaboko* de pescada-foguete, com uma melhor textura elástica (*ash*). Esses dois tratamentos térmicos foram significativamente melhores ($P < 0,05$) que o aquecido a 90° C por 30min, mas não apresentaram diferença entre si. Portanto, associando os resultados de compressão com a coesividade, tem-se a indicação de que o aquecimento em um único estágio e com a presença de BSA resultou na melhor combinação, com maior força de gel, expondo a proteína por um tempo de cocção menor. Um tempo prolongado de cocção, no tratamento térmico (B) a 90° C por 30min, trouxe maior prejuízo à estrutura protéica, desnaturando excessivamente a matriz do gel.

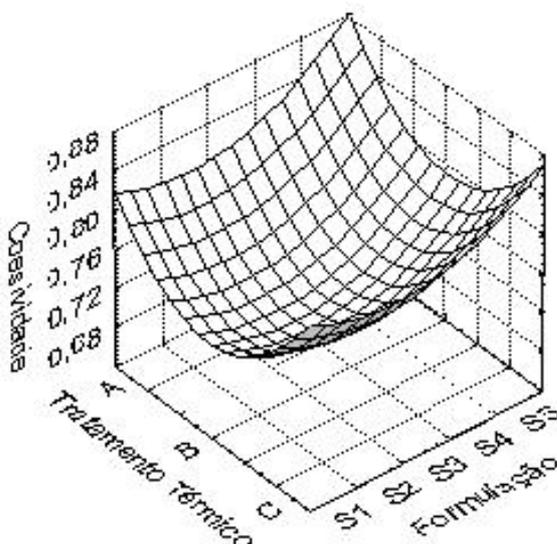


FIGURA 05. Caracterização da coesividade de géis de *surimi* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*) frente aos diferentes tratamentos.

Esses resultados de compressão e coesividade do gel sugerem uma contribuição dos inibidores no tratamento em dois estágios, ao favorecer uma melhor conformação das proteínas, caracterizando o *suwari*, uma vez que o aumento dos valores de compressão e coesividade dos géis de *surimi*, contendo os inibidores, indicam uma ação protetora na estrutura das proteínas miofibrilares, melhorando sua funcionalidade. Baseados em diferentes processos de aquecimento em géis de arenque do Pacífico (*Clupea arenagus pallassii*), Repond *et al.* (1995) também verificaram um favorecimento do *suwari*, pelo uso de diversos inibidores, com destaque para o extrato de batata, BSA e para clara de ovo, avaliando compressão, firmeza e torção.

Segundo Saeki *et al.* (1995), a força de gel de *surimi* de salmão (*Salmo salar*) é beneficiada com um pré-aquecimento (40-60°C) até 30min, o que confirmou os resultados com o gel de pescada-foguete. Aquecimento além desse tempo (30min), segundo os mesmos autores, propicia uma ação proteolítica, enfraquecendo o gel (*modori*). Boye e Lanier (1988), estudando o comportamento dos géis de xixarro do Atlântico, demonstraram que um tratamento a 40°C por 10min, prévio ao aquecimento a 90°C, por 10min, comportou-se como o mais adequado para o

assentamento das proteínas, atingindo melhores resultados no teste de compressão, sem a utilização de inibidores. Maiores tempo e temperatura, na primeira fase de aquecimento, aumentaram a atividade proteolítica, que atingiu atividade ótima a 60° C, pH 7,5 e tempo de 90-120min.

4.1.2 Influência dos inibidores BSA e clara de ovo

A Fig. 06 indicou que, os diferentes tratamentos, quando submetidos a uma força de compressão, apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre si e para o controle, independentemente do tratamento térmico. Dessa maneira, foi possível verificar que os inibidores empregados demonstraram capacidade de proteger a estrutura protéica responsável pela formação do gel, mesmo em condições próprias para a atividade proteolítica.

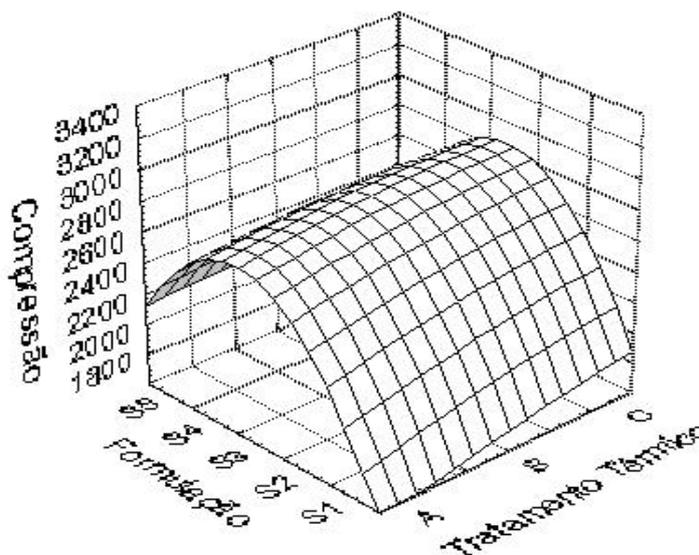


FIGURA 06. Caracterização da força de compressão (g) de géis de *surimi* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*) nos diferentes tratamentos.

A estrutura do gel, formado no *surimi* de merluza da Antártida, estudada por Reppond e Babbitt (1993), com a clara de ovo como inibidor, também foi superior ao controle no teste de firmeza, embora inferior às proteína do plasma (PPB). Para Wasson (1992), também o inibidor PPB a 3% foi mais efetivo do que o *surimi* contendo clara de ovo na mesma concentração. Os resultados de firmeza e

elasticidade de géis de *surimi*, tanto de sardinha (ROUSSEL e CHEFTEL, 1988) como de merluza da Antártida (CHUNG e LEE, 1990 e MORRISSEY *et al.*, 1993), indicaram que o BSA ou a clara de ovo aumenta a força do gel, em relação ao controle, comprovando os dados obtidos no experimento.

A maior estabilidade térmica da BSA pode explicar o seu melhor desempenho ($P < 0,05$) em relação ao de clara de ovo, nos testes de compressão e coesividade. O BSA, um dos componentes das proteínas do plasma bovino (PPB), apresenta a fração γ -globulina, que é termoestável e, segundo Raeker e Johnson (1995), requer maior temperatura de desnaturação. Seymour *et al.* (1997), estudando a BSA, em combinação com a fração globulina (FIV-1), demonstraram que o aumento da força de gel termo-induzido foi superior ao obtido com a fração isoladamente, o que sugere uma interação sinérgica entre a BSA e a fração α_2 -macroglobulina (α_2 -M). A concentração do inibidor é um fator adicional a considerar nos resultados obtidos, visto que 3% de BSA foi considerado uma concentração adequada para enriquecer o gel de *surimi*, equivalendo a 1% das proteínas do plasma (PPB), ou seja, acima da concentração utilizada neste experimento, com géis de *surimi* de pescada-foguete. Inclusive a albumina, ainda segundo Seymour *et al.* (1997), pode formar um gel próprio em concentrações maiores que 4%, incrementando as ligações dissulfeto e contribuindo para a estabilidade do gel.

Os aumentos na força de gel de *surimi*, contendo a clara de ovo, em relação ao controle, deve-se à presença de ovostatina (WEERASINGHE *et al.*, 1996b), a qual apresenta estrutura molecular e função homóloga à α_2 -M, além do mecanismo de inibição. A clara de ovo também contribui para o aumento da força de gel, através da capacidade de coagulação de suas proteínas (RAEKER e JOHSON, 1995), juntamente com a gelatinização do amido utilizado no gel de *surimi*. Isso ocasiona um aumento na viscosidade da massa protéica, a qual previne a coalescência das células de ar no interior da estrutura, aumentando o volume sem, no entanto, contribuir com a estabilidade da mesma.

4.1.3 Influência do NH₄Cl como inibidor da transglutaminase

O gel *kamaboko*, contendo NH₄Cl como inibidor da transglutaminase, associado ao BSA ou à clara de ovo, aumentou significativamente ($P < 0,05$) a força de gel, em relação ao controle (sem inibidor e sal de amônio) e aos géis com BSA e clara de ovo, somente. Como a transglutaminase tem uma ação oposta ao das proteases na proteção do gel, o aumento verificado para a força de gel, em relação aos géis com BSA e clara de ovo, indicou que não há presença dessa enzima no *surimi* de pescada-foguete. Se a transglutaminase estivesse presente, o sal de amônio deveria ter inibido sua atividade, principalmente nas etapas com o pré-aquecimento, enfraquecendo o gel, uma vez que a transglutaminase é uma enzima que pode estar naturalmente presente na carne de pescado e atuar como catalizadora, favorecendo a formação da estrutura protéica tridimensional responsável pela geleificação dos produtos à base de *surimi*, durante o processamento térmico, principalmente no aquecimento inicial, o que resulta no melhor assentamento das proteínas (*suwari*), resultando em uma força de gel superior (NIWA, 1992). Entretanto, esse comportamento somente foi verificado no teste de penetração, na formulação S5 (clara de ovo e NH₄Cl), onde a fraca força de gel foi devida, possivelmente, às características funcionais das proteínas da clara de ovo.

O comportamento do gel *kamaboko* de pescada com o sal de amônio difere daquele encontrado por Kumazawa *et al.* (1995), no *surimi* de merluza da Antártida, o qual confirmou a ação da enzima nesse gel, ao verificar uma redução de 50% na força de gel, com o uso de NH₄Cl como inibidor da enzima. A ausência da transglutaminase no gel de *surimi* de pescada-foguete é confirmada no experimento pela maior força de compressão na formulação S3, contendo BSA e NH₄Cl.

4.1.4 Influência da umidade

O conteúdo médio de umidade do *surimi* de pescada-foguete alcançou um valor médio de 79%. Na Tab. 05 estão demonstradas, além do valor médio geral de umidade, as médias referentes aos tratamentos.

Tabela 05. Valores de umidade no *surimi* de pescada-foguete (*Macrodon Ancyloдон*).

TRATAMENTO ¹	UMIDADE(%)
SC	79,2539
SBSA	80,2589
SEW	78,4710
Total	79,3174

¹ *Surimi*: SC, controle; SBSA, com BSA; SEW, com clara de ovo.

O teor de umidade é um dos fatores críticos no processamento do *surimi* e tem influência significativa na textura do gel *kamaboko*. Os percentuais de umidade, descritos na Tab. 05 foram menores do que os encontrados Kuhn e Prentice (1999), onde a melhor umidade do *surimi* de pescada foguete atingiu a faixa de 82%. Nos produtos a base *surimi*, um menor conteúdo de umidade possibilitará um gel com maior qualidade, o que se refletirá numa maior força de gel.

Os níveis de umidade dos géis *kamaboko*, relatados na Tab. 04 (item 4.1), sofreram influência significativa ($P < 0,05$) das formulações e dos tratamentos térmicos, o que foi caracterizado na Fig. 07.

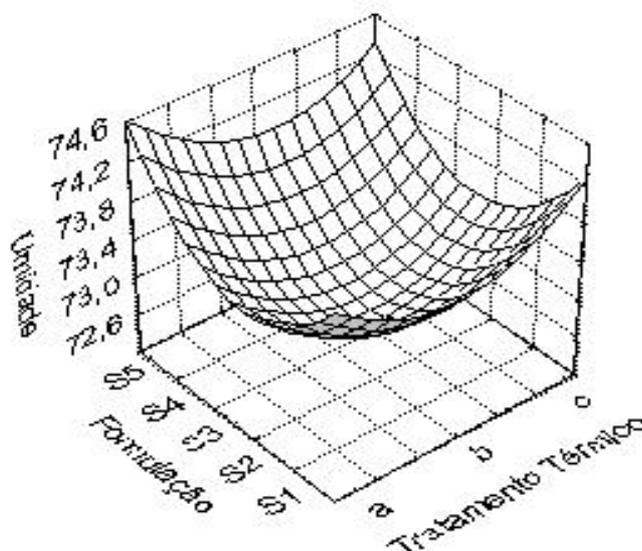


FIGURA 07. Interação dos tratamentos na umidade de géis *kamaboko* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

Os menores teores de umidade nos géis *kamaboko* da pescada-foguete foram encontrados nas amostras que continham BSA como inibidor, nos tratamentos S2 e S3, o que foi devido às condições de processamento (item 3.2.1) e características dos inibidores (ítems 2.5 e 4.1.2).

O menor conteúdo de umidade nas amostras com BSA induziu uma maior força de compressão. Em estudo anterior, Kuhn e Santos (1998), mencionaram que a maior firmeza do gel *kamaboko* de pescada-foguete pôde ser alcançada com menor umidade, desde que, elaborado com número de lavagens inferior a três ciclos e proporção de água, em relação à carne de 3:1, similares às do presente experimento.

A Fig. 08 permite uma visualização dessas condições de umidade, expondo resultados do teste de compressão dos géis *kamaboko* da pescada-foguete, em função dos tratamentos térmicos e da umidade.

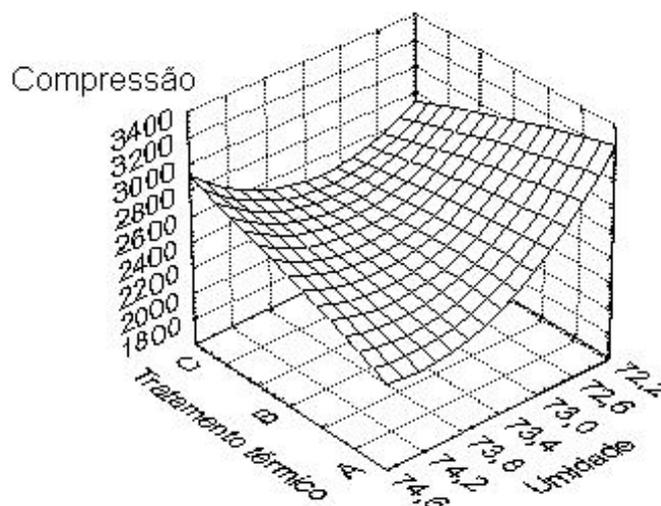


FIGURA 08. Influência da umidade e do tratamento térmico na força de compressão (g) dos géis de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

O valor médio de 2511g para a força de gel, no teste de compressão, com umidade média de 73%, foram similares aos obtidos por Reppond e Babbitt (1997), os quais encontraram as maiores forças de gel na faixa de umidade entre 70–74%, para o *surimi* de várias espécies de pescado, como merluza da Antártida, arenque do pacífico e merluza comum.

4.1.5 Influência da concentração de sal nos géis *kamaboko*

Os géis de *surimi* contendo maior concentração salina, nos tratamentos S3 e S5 (contendo os inibidores BSA e clara de ovo, respectivamente), apresentaram resultados de compressão e coesividade significativamente melhores ($P < 0,05$) do que o controle e entre si, indicando que o tratamento com BSA foi o mais adequado, devido às características da proteína (item 4.1.2) na estrutura tridimensional do gel formado.

O sal é fundamental na formação do gel *kamaboko*, já que na sua ausência o *surimi* não apresenta essa capacidade, devido à insolubilidade da proteína miofibrilar. Considerando esse aspecto, adotou-se uma concentração de sal máxima no gel *kamaboko* de pescada-foguete próxima de 3%, concentração adequada para formar a maioria dos géis de pescado. Essa concentração presente nas amostras S3 e S5, possibilitou uma solubilização maior das proteínas, possivelmente da miosina. A maior solubilização permite que a molécula desprenda-se dos filamentos espessos, dispersando-se na solução como monômeros, criando no aquecimento uma rede tridimensional ordenada (LIN e PARK, 1996, 1998; SUZUKI, 1987; LEE, 1984, 1986).

A concentração de sal foi determinante para a mudança na conformação da proteína ao aumentar as interações eletrostáticas e forças hidrófobas. Para Lin e Park (1998), quando a miosina está agregada no músculo, há uma forte interação proteína-proteína com baixa proporção área/volume superficial, tornando-a insolúvel. Quando o sal é introduzido, os íons positivos e negativos ligam-se a cargas opostas e rompem as ligações iônicas. De acordo com Niwa (1992), a quebra das ligações intra e intermoleculares da molécula protéica, pela força iônica, proporciona um desdobramento da estrutura, expondo grupamentos sulfidrílicos, antes ocultos pela própria conformação nativa da proteína, causando um aumento na sua exposição e oxidação, formando ligações dissulfeto para estabilizar a estrutura protéica.

4.1.6 Influência da integridade protéica

Na Tab. 06 é visualizada a integridade da proteína presente no *surimi*, através do Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM), o qual indica o dano na miofibrila, decorrente do processamento.

Tabela 06. Índice de Fragmentação Miofibrilar para o *surimi* e *kamaboko**

	Tratamentos					
	<i>Surimi</i> ¹			<i>Kamaboko</i> ²		
	SC	SBSA	SEW	A	B	C
IFM	12,12a	9,70a	10,2a	15,82c	16,84c	17,74b

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

¹ *Surimi*: SC, controle; SBSA, com BSA; SEW, com clara de ovo.

² *Kamaboko*: (A) aquecimento a 90° C por 15'; (B) 90° C por 30'; (C) aquecimento a 60° C por 30', seguido de 90° por 15'.

Menor Índice de fragmentação miofibrilar (IFM) indica melhor qualidade da proteína, pela sua maior integridade. Serve como parâmetro para avaliar as condições da matéria-prima (resíduo de pescado) submetida ao processamento.

Os valores do índice de fragmentação para o *surimi* com inibidores foram melhores em relação ao controle, proporcionando uma maior proteção da proteína, provavelmente pelo efeito sinérgico entre os inibidores e os crioprotetores, o que concorda com o sugerido por Morrissey *et al.* (1993) e An *et al.* (1992), os quais citam que a adição de inibidores no processamento de *surimi* juntamente com os crioprotetores, contribui para uma melhor proteção das miofibrilas. A adição desses compostos no processamento de *surimi* juntamente com os crioprotetores, imediatamente antes do congelamento, exige, segundo esses autores, níveis e concentração menores para os inibidores e que as diferenças observadas nos níveis ótimos de inibição podem estar relacionadas à etapa do processamento no qual o inibidor é adicionado.

O IFM do *kamaboko* encontrado na Tab. 06 avaliou os danos inerentes ao processo térmico. O tratamento térmico apresentou influência significativa ($P < 0,05$) no IFM dos géis *kamaboko*. Pelos resultados, verificou-se que o aquecimento em duas etapas (C) não foi o mais adequado, com um índice de quebra maior na proteína. Os tratamentos (A) e (B) não apresentaram diferença significativa entre si. Embora não significativo, verificou-se que o tratamento (A) apresentou o menor

índice de fragmentação e, considerando que há um menor tempo de exposição da proteína ao aquecimento, esse deve ser o mais adequado, pois demonstrou um menor dano na matriz do gel. A escolha do tratamento (A) confirmou-se ao analisar a Fig. 09, onde se demonstra a interação entre os tratamentos no índice de fragmentação.

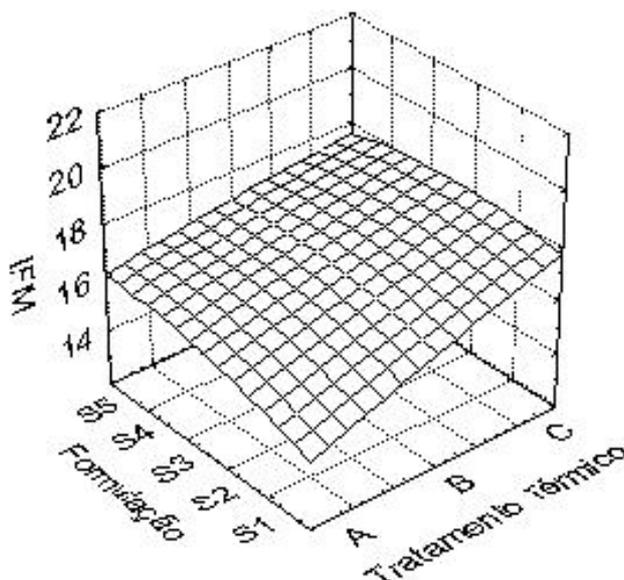


FIGURA 09. Interação dos tratamentos no índice de fragmentação miofibrilar em géis *kamaboko* de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*).

A superfície de resposta permitiu visualizar o comportamento do tratamento térmico (A) e constatar que a maior inclinação da superfície foi devido ao processo de aquecimento ao qual o *surimi* foi submetido para obtenção do gel *kamaboko*.

A menor quebra das miofibrilas, evidenciada principalmente no tratamento térmico (A), permitiu a manutenção da organização estrutura protéica, o que acontece dentro de pequenos segmentos das miofibrilas, durante o processamento térmico, com pouca influência da temperatura de armazenamento (OLSON *et al.*, 1976; DAVEY e GILBERT, 1968).

4.1.7 Eletroforese SDS-PAGE

O resultado da eletroforese SDS-PAGE encontra-se nas Figs. 10 e 11, onde se pôde visualizar o papel dos inibidores na proteção do gel *kamaboko*.

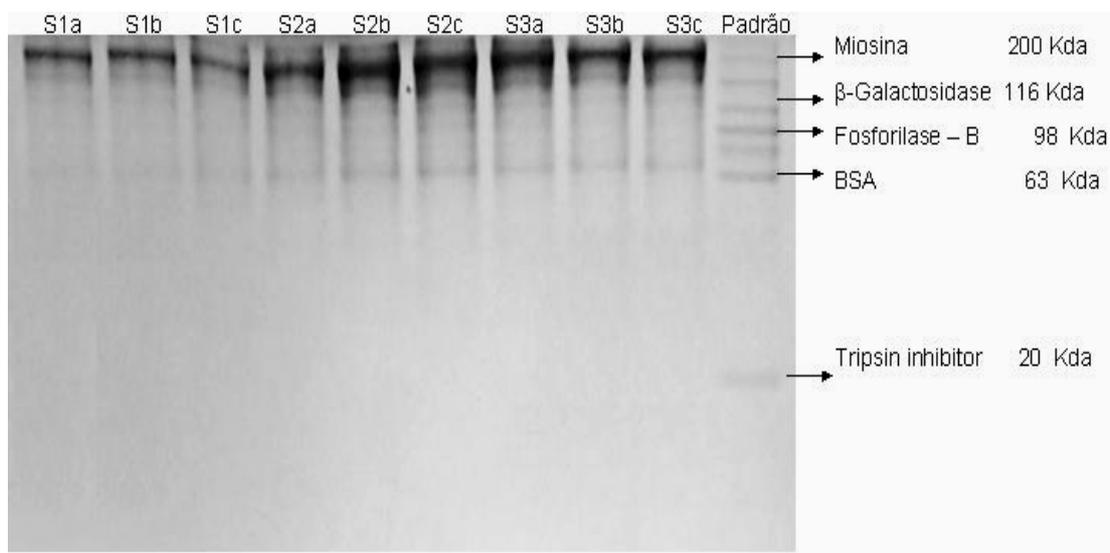


FIGURA 10. Gel 10% mostrando o efeito da BSA sobre os géis *kamaboko*: aplicação de 40 μ g de proteína. S1: controle; S2: BSA; S3: BSA e combinação de sais. (a): 90° C, 15min; (b): 90° C, 30min; (c): 60° C, 30min seguido de 90° C, 15min.

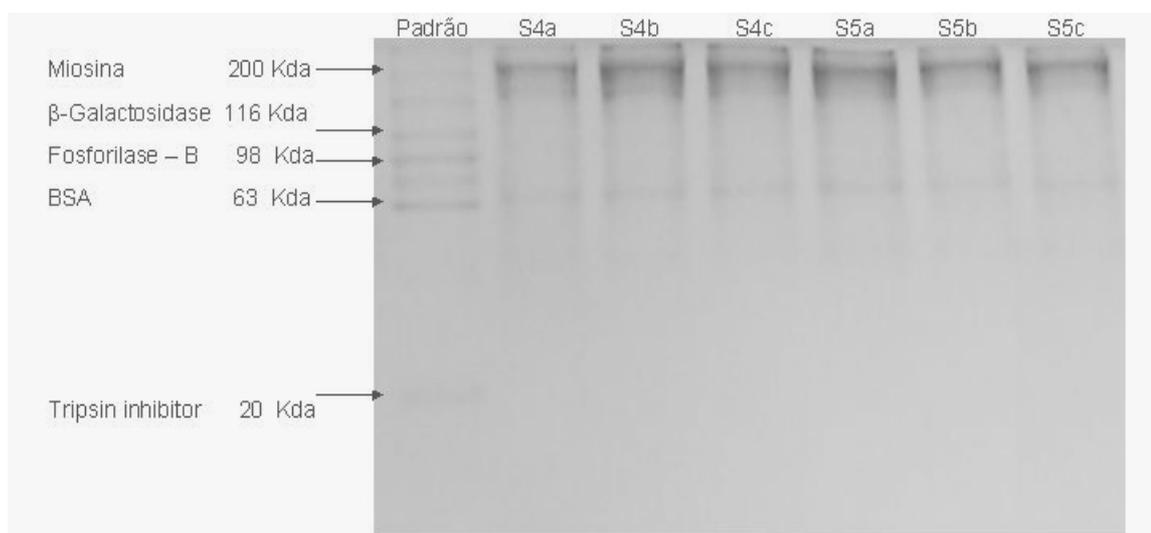


FIGURA 11. Gel 10% mostrando o efeito da clara de ovo sobre os géis *kamaboko*: aplicação de 40 μ g de proteína. S4: clara de ovo; S5: clara de ovo e combinação de sais; (a): 90° C, 15min; (b): 90° C, 30min; (c): 60° C, 30min seguido de 90° C, 15min.

Para o controle (S1), a predominância de bandas de alto peso molecular, com boa intensidade, mesmo na ausência dos inibidores, foi indicativo de uma pouca atividade proteolítica. Observando o perfil eletroforético das bandas dos géis *kamaboko* contendo inibidores, constatou-se uma intensidade maior nas bandas das proteínas de alto peso molecular, em relação ao controle (S1), revelando que as amostras contendo os inibidores BSA e clara de ovo, protegeram a estrutura protéica. Porém, nos tratamentos com o inibidor BSA (S2 e S3) observou-se maior proteção das miofibrilas em relação àqueles com clara de ovo (S4 e S5), devido à maior intensidade dessas bandas.

Portanto, demonstrou-se que a interação entre BSA e as miofibrilas foi maior, confirmando que as frações do plasma têm comportamento melhor na proteção do gel do que a clara de ovo, conforme já foi observado em outras espécies de pescado por Morrissey *et al.* (1993), e Seymour *et al.* (1997), caracterizando que o comportamento do gel de *surimi* de pescada-foguete foi similar ao de espécies como merluza, arenque do Pacífico, salmão, truta, entre outras.

No entanto, Weerasinghe *et al.* (1996b), estudando as frações do plasma, constataram que a albumina de soro bovino teve uma fraca atuação específica como inibidor da atividade proteolítica para o *surimi* da merluza comum, mesmo em altas concentrações. Para os autores, o principal componente ativo de inibição de proteases é uma proteína do plasma de alto peso molecular, a qual pode ser polimerizada através de ligações covalentes, passando a ser resistente à proteólise.

A intensidade das bandas nos géis contendo clara de ovo pode ser resultado, ainda segundo Weerasinghe *et al.* (1996b), da combinação de uma proteína de alto peso molecular homóloga a α_2 -M, presente nas frações do plasma. Entretanto, Hamman *et al.* (1990), estudando o perfil eletroforético de géis de xizarro do Atlântico e da merluza da Antártida, visualizaram igualmente, bandas mais intensas na faixa da miosina, caracterizando a atividade protetora do inibidor clara de ovo,

atribuída à α_2 -M, que segundo estes autores é capaz de inibir uma grande gama de enzimas proteolíticas.

Tanto o controle como os demais tratamentos não apresentaram bandas mais leves, com proteínas de baixo peso molecular inferior a 60 Kda, resultante da atividade de proteases, mesmo quando submetidos ao pré-aquecimento, indicando ausência de uma atividade intensa de proteases capazes de degradar a estrutura protéica das miofibrilas. O perfil eletroforético obtido confirma ainda os resultados do índice de fragmentação, indicando uma integridade estrutural da proteína presente nos géis. A ausência de atividade proteolítica, como sugerem os resultados da eletroforese, concordou também com o reportado por Reppond *et al.* (1995), onde os géis de arenque do Pacífico, igualmente não demonstraram atividade proteolítica, com diferentes inibidores, entre os quais encontrava-se a clara de ovo. A atividade proteolítica em géis de *surimi* de salmão (SAEKI *et al.*, 1995) a 60°C, somente foi encontrada a partir de uma hora de pré-aquecimento e, em tempos maiores, com temperaturas entre 30-50°C. Portanto, a ausência de proteólise no gel de *surimi* de pescada-foguete no experimento, pode ser explicada pelo tempo de aquecimento insuficiente para desenvolver o fenômeno.

Pela ausência de bandas de baixo peso molecular deduz-se que o tratamento térmico aplicado gerou apenas uma leve desnaturação na estrutura protéica do gel, desdobrando a estrutura das proteínas presentes, formando o gel, que segundo Ziegler e Acton (1984), não se caracteriza como um processo aleatório e desordenado, mas como um conjunto de alterações num processo contínuo, com modificações na molécula protéica em diferentes velocidades. Todas as alterações mencionadas envolvem mudanças na estrutura secundária, terciária ou quaternária da proteína.

A presença dos inibidores, utilizados no experimento para o gel *kamaboko*, mostrou-se fundamental no aumento da força de gel, pois as amostras contendo esses compostos apresentam maior resistência nos testes de compressão e

coesividade, o que pode ser confirmado pela intensidade das bandas na eletroforese. Há dificuldade experimental de demonstrar que o aumento na força de gel decorre de ação isolada, através de mecanismo inibitório (WEERASINGHE *et al.*, 1996b; WASSON, 1992; PORTER *et al.*, 1993; NIWA, 1992), ou em conjunto, dependendo também das propriedades funcionais do inibidor.

5 CONCLUSÕES

1. Os inibidores Albumina do soro bovino (BSA) e clara de ovo são eficazes na proteção da estrutura miofibrilar, aumentando a força de gel do *surimi* de sub-
produtos de pescada-foguete;
2. O inibidor BSA é melhor do que a clara de ovo na proteção do gel de *surimi*
de sub-
produtos de pescada-foguete;
3. O *surimi* de sub-
produtos de pescada-foguete nas condições processadas,
não contém a transglutaminase, porque a presença do inibidor dessa enzima
não diminuiu a força de gel;
4. No gel *kamaboko* de *surimi* de sub-
produtos de pescada-foguete, sem
inibidores (controle) e nos tratamentos utilizados, há pouca atividade
proteolítica;
5. Uma concentração salina de 2,7% nos géis *kamaboko* de *surimi* de sub-
produtos de pescada-foguete possibilitou maior força de gel, nos ensaios de
compressão;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAZAWA, H.; MIYAUCH, Y.; SAKURADA, K. *et al.* Evaluation of proteinase inhibitors in Pacific whiting *surimi*. **Journal of Aquatic Food Products Technology**, v. 2, n.3, p.79-95. 1993.

AN, H.; CHUNG, Y. C.; MORRISSEY, M. T. Proteolysis of Pacific whiting and its inhibition. In Pacific Whiting: Harvesting, Processing, Marketing and Quality. G. Sylvia and M. T. Morrissey (Ed.) **Oregon Sea Grant Publication**, p. 36-37, Corvallis, OR. 1992.

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.

AN, H.; SEYMOUR, T. A.; MORRISSEY, M. T. *et al.* Assay systems and characterization of Pacific Whiting (*Merluccius productus*) protease. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 277-281. 1994a.

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. 1994b.

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.

AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 16th Edition. Arlington, 1995

ARÉAS, J. A. G.; LAWRIE, R. A. Effect of lipid – protein interactions on extrusion of offal protein isolates. **Meat Science**, v. 7, p. 275-299. 1984.

ASHIE, I. N. A.; SIMPSON, B. K. α_2 -Macroglobulin inhibition of endogenous proteases in fish muscle. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 357-361. 1996.

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.

BABBITT, J. K.; REPPOND, K.D. Factors affecting the gel properties of *surimi*. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 965-966. 1988.

BARRETO, P. L. M.; BEIRÃO, L. H. Influência do amido e carragena nas propriedades texturais do *surimi* de Tilápia (*Oreochromis SP.*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 19, p. 183-188. 1999.

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.

CHUNG, K. H.; LEE, C. M. Relationships between physicochemical properties of nonfish protein and textural properties of protein incorporated *surimi* gel. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 972-975. 1990.

DAVEY, C. L.; GILBERT, K. V. Studies in meat tenderness 4: Changes in the Extractability of myofibrils during meat aging. **Journal of Food Science**, v. 34, p.69-74. 1968.

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 of Food and Agriculture**, v. 27, p. 197-204. 1976.

GLOBEFISH BATABANK – FAO. Market Trends. **Infofish International**, n. 3, p.41-44. 2000.

HAMMANN, D. D.; AMATO, P. M.; WU, M. C. *et al.* Inhibition of *modori* (gel weakening) in *surimi* by plasma hydrolysate and egg white. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 665 – 669, 795. 1990.

HEMPEL, E. *Surimi* in south East Asia. **Seafood International**, p. 25-27. February 1999.

HOLMES, K. *Surimi* suffers from a yen for extremes. **Seafood International**, p. 27-29. September 1998.

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.

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 and 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 dos trabalhos vencedores. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Rio de Janeiro, p. 181-211. 1999.

KUHN, C. R.; SANTOS R. C. **Estudo tecnológico para obtenção de *surimi* utilizando resíduos do processamento de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*)**. Trabalho de conclusão (Graduação em Engenharia de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande, FURG. Rio Grande, RS. 1998.

KUHN, C. R.; SOARES, G. J. D. Proteases e inibidores no processamento de *surimi*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, n. 1, p. 5-11. 2002.

KUMAZAWA, Y.; NUMAZAWA, K.; SEGURO, K. *et al.* Suppression of *surimi* gel setting by transglutaminase inhibitors. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 715-717, 726. 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.

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.
- LEE, C. M. *Surimi* process technology. **Food Technology**, v. 38, n. 11, p. 69-80. 1984.
- LEE, C. M. *Surimi* manufacturing and fabrication of *surimi* based products. **Food Technology**, v. 40, p. 115-124. 1986.
- LEE, C. M.; CHUNG, K. H. Analysis of *surimi* gel properties by compression and penetration tests. **Journal of Texture Studies**, 20, p. 16363-367. 1989.
- 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.
- LIN, T. M.; PARK, J. W. Extraction of proteins from Pacific whiting mince at various washing conditions. **Journal of Food Science**, 61: 432-438. 1996.
- LIN, T. M.; PARK, J. W. Solubility of Salmon myosin as affected by conformational changes at various ionic strengths and pH. **Journal of Food Science**, 61: 432-438. 1998.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, n. 193, p. 265-275. 1951.
- 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-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.
- 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.

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. Chemistry of *surimi* gelation. In: **Surimi Technology**, Ch 16. T. C. Lanier and C. M. Lee (Ed), p. 389-428. Marcel Dekker, Inc., New York. 1992.

NOMATA, H.; TOYOHARA, H.; MAKINODAN, Y. *et al.* The existence of proteinases in chum salmon muscle and their activities in the spawning stage. **Bulletin of Japanese Society of Science Fisheries**, v. 51, p. 1799-1804. 1985.

OLSON, D. G.; PARRISH JR., F. C. STROMER, M. H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, v.41, p. 1036-1040. 1976.

OPPFELT, D. New options for novel processed foods. **Food Technology**, v. 40, n. 11, p. 13-15. 1986.

PATASHNIK, M.; CRONINGER, H. S.; BARNETT, H. *et al.* Pacific whiting (*Merluccius productus*): abnormal muscle texture caused by Myxosporidian-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.

RAEKER, M. Ö.; JOHNSON, L. A. Thermal properties of bovine blood plasma and egg white proteins. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 685-690, 706. 1995.

REPPOND, K. D.; BABBITT, J. K. Gel properties from various fish species as affected by moisture content. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 33-36. 1997.

REPPOND, K. D.; BABBITT, J. K. Protease inhibitors affect physical properties of arrowtooth flounder and walleye Pollock *surimi*. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 96-98. 1993.

REPPOND, K. D.; BABBITT, J. K.; BERNSTEN, S. *et al.* Gel properties of *surimi* from Pacific herring. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 707-710,714. 1995.

ROUSSEL, H.; CHEFTEL, J. C. Characteristics of *surimi* and *kamaboko* from sardines. **Journal of Food Science and Technology**, v. 23, p. 607-623. 1988.

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.

SAKAMOTO, H.; KUMAZAWA, Y.; TOIGUCHI, S. *et al.* Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore *surimi* manufacture. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 300-304. 1995.

SEKI, N. Identification of fish species by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the myofibril 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 and Food Chemistry**, v. 42, p.2421-2427. 1994.

SEYMOUR, T. A.; PETERS, M. Y.; MORRISSEY, M. T. *et al.* *Surimi* gel enhancement by bovine plasma proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2919-2923. 1997.

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.

SOARES, G. J. D.; ARÊAS, J. A. G. Effect of Electrical Stimulation on *Post mortem* Biochemical Characteristics and Quality of *Longissimus dosrsi thoracis* Muscle from Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Meat Science**, v. 41, n. 3, p. 369-379. 1995.

STATSOFT INC. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK, USA. 1998.

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 croacker (*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.

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.

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.

WASSON, D. H. Fish muscle proteases and heat-induced myofibril 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. 1996a.

WEERASINGHE, V. C.; MORRISSEY, M. T.; AN, H. Characterization of active components in food-grade proteinase inhibitors for *surimi* manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2584-2590. 1996b.

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. 1991a.

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. 1991b.

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.

YATES, F. The design and analysis of factorial experiments. **Harpenden**, Imperial Bureau of Soil Science. 1937.

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.

ZIEGLER, G. R.; ACTON, J. C. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. **Food Technology**, v. 38, p. 77-82. 1984.