

# Determinación de la presencia y el origen del fenómeno modori en surimi de cinco especies de pescado del Golfo de México

## Determination of the modori phenomenon and its origin in surimi of five fish species from the Gulf of Mexico

E. Ramos-Martínez<sup>1</sup>, O.G. Morales-González<sup>2</sup>, J.A. Ramírez<sup>1</sup>, F.L. García-Carreño<sup>3</sup> y J.G. Montejano-Gaitán<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala Colonia Aztlán., Reynosa, Tamaulipas 88740, México. <sup>2</sup>Instituto de Ecología y Alimentos, U.A.T. <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. <sup>4</sup>Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro, México.

El Modori es un fenómeno característico de los geles de pescado que induce una disminución en sus propiedades mecánicas cuando los geles se obtienen a una temperatura entre 50 y 60 °C. La causa de este fenómeno son las proteasas endógenas, que varían de acuerdo a la especie de pescado. Se obtuvieron surimis de croca (*Micropogon undulatus*), ronco (*Conodon nobilis*), lenguado (*Cyclopsetta chittendeni*), ratón (*Menticirrhus saxatilis*) y soldado (*Prionotus evolans*). Se determinó el efecto de la incubación a 60 °C durante 0, 20 y 40 min, con un calentamiento posterior a 90 °C durante 15 min, en el esfuerzo de cizallamiento y la deformación de cizallamiento en geles de surimi, la presencia de péptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) y el patrón electroforético (SDS-PAGE). El fenómeno modori provocó una pérdida significativa (25–50%) de las propiedades mecánicas en las cinco especies estudiadas. Este fenómeno estuvo asociado con la presencia de proteasas activas a 60 °C, determinada por un incremento en los valores de péptidos solubles en TCA en función del tiempo de incubación; la miosina fue el sustrato principal de las proteasas, mientras que la actina se hidrolizó. El empleo de inhibidores específicos, mostró que los dos tipos serín- y cisteín-proteasas están asociadas con el fenómeno modori en estas especies.

*Palabras clave:* surimi, modori, proteasas, inhibidores

Modori is a phenomenon which occurs in fish gels only when they are incubated at 50–70 °C, and which induces a decrease in their mechanical properties. Modori has been associated with endogenous proteases, varying among fish species. Surimis were obtained from Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*), barred grunt (*Conodon nobilis*), sole (*Cyclopsetta chittendeni*), northern kingfish (*Menticirrhus saxatilis*) and striped searobin (*Prionotus evolans*). The effect of gel incubation time on shear stress and shear strain at failure, soluble peptides and electrophoretic pattern was studied. Incubation times at 60 °C, of 0, 20 or 40 min were assayed. The modori phenomenon induced a significant decrease (25–50%) in the mechanical properties of the five species studied. This phenomenon was associated with the presence of active proteases at 60 °C, determined as an increase in concentration of soluble peptides depending on the time of incubation. Proteases were partially characterized employing serine- and cysteine-protease inhibitors. The studies with SDS-PAGE showed that myosin is the main substrate of the proteases. Actin was not hydrolyzed. The employment of specific inhibitors showed that both serine- and cysteine-proteases were associated with the modori phenomenon in the species studied.

*Keywords:* surimi, modori, proteases, inhibitors

---

\*To whom correspondence should be sent.

Received 20 October 1997; revised 19 October 1998.

---

Food Sci Tech Int 1999;5(5):397–405  
© 1999 Aspen Publishers, Inc.

## INTRODUCCIÓN

El surimi es una pasta de proteína miofibrilar de músculo de pescado obtenida a través de lavados repetidos con agua fría, cuya gelificación presenta un comportamiento especial que la diferencia de las

proteínas miofibrilares de mamíferos y aves. La utilización de cloruro de sodio del 2 al 3%, permite la solubilización de las proteínas miofibrilares para obtener soles proteicos que posteriormente se someten a un tratamiento térmico para inducir la formación del gel. Las características estructurales de los geles, dependen de la temperatura a la que se incuben los soles. Si la gelificación se induce por debajo de los 40 °C, se obtiene un gel elástico y poco cohesivo llamado suwari; si se somete a temperaturas cercanas a 60 °C se forma un gel mal estructurado llamado modori; mientras que a temperaturas superiores a los 70 °C, los geles presentan buena cohesividad y elasticidad y se denominan productos tipo kamaboko (Niwa, 1992).

La temperatura además de ser importante en los efectos de la conformación de proteínas miofibrilares, activa las enzimas endógenas que de forma natural están presentes en el músculo de pescado. El fenómeno modori implica la desintegración estructural del gel (Shimizu *et al.*, 1981) que se manifiesta en una pérdida del esfuerzo de cizallamiento a la rotura y la deformación a la rotura de los geles de surimi. El modori se asocia con proteasas endógenas termoestables que se activan a temperaturas entre 50 y 70 °C, y degradan rápidamente a la miosina (An *et al.*, 1994; Yongsawatdigul *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha sugerido la posibilidad de que el modori tenga un origen diferente al proteolítico, debido a la presencia de proteínas no enzimáticas presentes en el surimi. También se considera que la temperatura entre 50 y 60 °C puede tener un efecto específico sobre el mecanismo de desnaturalización y agregación que origina la formación del gel (Niwa, 1992).

La actividad de las proteasas asociadas con el modori varía según la especie de pescado, lo que explicaría porqué la susceptibilidad al modori depende también de la especie (Matsumoto y Noguchi, 1992). El fenómeno modori se observa en barracuda café (*Sphyrna sp.*), carpa (*Cyprinus carpio*), pez lagarto (*Saurida sp.*) y roncadador amarillo (*Micropogonias furnieri*) (Niwa, 1992), croca del Atlántico (*Micropogon undulatus*) (Lin y Lanier, 1980; Su *et al.*, 1981), roncadador blanco (*Micropogon opercularis*) (Busconi *et al.*, 1984), lisa (*Mugil cephalus*) (Deng, 1981) y merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) (García-Carreño *et al.*, 1995). También se ha observado en algunas especies del Golfo de México: lenguado (*Cyclopsetta chitendenni*), lisa (*Mugil cephalus*) (Morales *et al.*, 1995 y 1996) y serrano (*Dipllectrum formosum*) (Montejano *et al.*, 1997). El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del fenómeno modori en cinco especies de pescado del Golfo de México y establecer si está asociado con la presencia de actividad proteolítica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestras

Se emplearon croca (*Micropogon undulatus*), ronca (*Conodon nobilis*), lenguado (*Cyclopsetta chitendenni*), ratón (*Menticirrhus saxatilis*) y soldado (*Prionotus evolans*) capturados frente a las costas de Altamira, Tamaulipas, México, la noche anterior a su procesamiento. Se les eliminó las vísceras, se lavaron y se mantuvieron en hielo para transportarlos al laboratorio y se procesaron aproximadamente 8 horas después de su captura. Los pescados medían de 10 a 20 cm de longitud dependiendo de la especie y pesaban menos de 150 g cada uno.

### Preparación de las muestras de surimi

Se siguió la técnica descrita por Montejano y Morales (1991). Los pescados descabezados y eviscerados se lavaron con agua fría (<10 °C), eliminando los residuos de sangre y de peritoneo. La pulpa se obtuvo introduciendo los pescados en una deshuesadora mecánica (Bibun modelo NF-2-DX, Fukuyama, Miroshima, Japan) con orificios de tambor de 5 mm de diámetro. La pulpa se lavó 3 veces con una mezcla de agua y hielo a una temperatura inferior a 10 °C, con una proporción agua/pulpa de 3:1 (la pulpa varió de 3 a 8 kg dependiendo de la especie). La mezcla se agitó continuamente durante 10 min, se dejó reposar durante 3 min, para eliminar la mayor cantidad de agua por decantación, con el fin de eliminar grasa y los compuestos hidrosolubles. En el tercer lavado se adicionó 0,2% de NaCl. La eliminación de agua se realizó por filtración con pañalina. Se incorporó 8% de sacarosa (p/p) como crioprotector en una mezcladora Hobart (modelo VCM, Troy, Ohio, USA). Las muestras se refrigeraron durante 1 hora a 4 °C, para evitar que la temperatura final fuera mayor de 10 °C. En esta etapa no se ajustó el contenido de humedad.

Los surimis de cada especie se envasaron en bolsas de polietileno y se congelaron a -30 °C durante 3 horas, en un congelador de placas Crepaco modelo B-5854-AM12 (Crepaco Inc., Chicago, IL). Las muestras de surimi se mantuvieron un mes a -20 °C hasta su empleo.

### Obtención de los geles

Se mezclaron muestras de surimi con 2,5% de cloruro de sodio en una cortadora de carne Hobart modelo 84145 (Troy, Ohio, USA) durante 5 min. El surimi estaba aún congelado y la temperatura ambiente era inferior a los 15 °C, lo que permitió mantener la temperatura entre

### Fenómeno modori en surimi

0 a 4 °C. Cada pasta de pescado se embutió en tubos de acero inoxidable de 2 cm de diámetro y 25 cm de largo, con tapas de rosca, utilizando una embutidora manual Poli modelo E17-1 (Polinox S.A., México, D.F.). Los tubos se incubaron a 60 °C durante 0 (control) 20 y 40 min, con una cocción posterior a 90 °C durante 15 min, colocándolos rápidamente en agua fría a 5 °C ( $\pm 2$  °C). Los tubos se almacenaron en refrigeración durante 24 horas antes de desmoldar los geles. La temperatura al centro del gel se determinó con un termómetro de aguja en un tubo adicional.

### Análisis

La humedad se determinó por secado de las muestras de surimi a 102 °C hasta peso constante, y las proteínas por el método Kjeldahl según los métodos oficiales de la AOAC (AOAC, 1980).

### Prueba de torsión

Se determinaron el esfuerzo de cizallamiento y la deformación de cizallamiento, según el método descrito por Montejano y Morales (1991). A los geles de surimi se les dio forma de mancuerna con un diámetro mínimo de 1 cm en el centro, empleando un esmeril de mesa adaptado especialmente para este propósito. Las muestras se fijaron de sus extremos con un dispositivo especial en un viscosímetro Brookfield modelo 5XHBTD (Brookfield Eng. Labs., Inc. Stoughton, Ma.). Las muestras se sometieron a una fuerza rotacional con velocidad de giro de 2,5 rpm. Los valores de unidades Brookfield de torque y el número de giros se utilizaron para calcular el esfuerzo y la deformación cortante. Para cada tipo de gel se efectuaron 10 mediciones.

### Determinación de proteólisis en surimi

Se prepararon dos lotes por triplicado, en tubos Eppendorf de 1,5 mL, conteniendo 400 mg de surimi. A un lote se le adicionó un 2,5% de cloruro de sodio y al otro no se le adicionó la sal. Ambos lotes se homogeneizaron con varilla de vidrio en el interior del tubo. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 0 (control), 20 y 40 min. Al finalizar de la incubación se adicionó 1,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% para detener la reacción. Los tubos se centrifugaron a 16 000 x g durante 5 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5415 (Eppendorf, Alemania). Se mezclaron 600  $\mu$ L del sobrenadante con 600  $\mu$ L del reactivo de Bradford para determinar los péptidos solubles en ácido tricloroacético, de acuerdo con el método de Robyt y

White (1990). Se empleó un espectrofotómetro Bausch & Lomb modelo 2000 (Bausch & Lomb Spectronic Co. Rochester, NY) y se midió la absorbancia a 595 nm.

### Obtención de extractos enzimáticos

Se homogeneizaron 100 g de surimi de cada una de las especies de pescado con 200 mL de cloruro de potasio al 0,5% en una licuadora a baja velocidad durante 2 min. El homogeneizado se filtró en papel Whatman No. 4. La fracción soluble se calentó a 55 °C durante 5 min para insolubilizar la proteína térmicamente inestable y se centrifugó a 10 000 x g a 10 °C durante 30 min. El sobrenadante se almacenó 16 horas en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

### Actividad enzimática del extracto

Al extracto crudo obtenido de cada especie se le determinó la actividad enzimática, utilizando como sustrato caseína (Sigma chemical, Co., St. Louis, MO). A 400 mL de una disolución de caseína al 2% en TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, se le adicionaron 400 mL de extracto crudo de pescado, incubando las muestras a 60 °C durante 0, 60, 120 y 180 min. Al finalizar la incubación se adicionaron 800 mL de ácido tricloroacético al 5% para detener la reacción. De los tubos homogeneizados y centrifugados a 16 000 x g en una centrifuga Eppendorf modelo 5415 (Eppendorf, Alemania) durante 5 min, se tomaron 600 mL del sobrenadante para medir los péptidos solubles por el método de Bradford (Robyt y White, 1990). La actividad enzimática se expresó en (g de péptidos solubles/mL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Electroforesis (SDS-PAGE)

Se empleó una modificación del método de Wasson *et al.* (1992). Se incubaron 400 mg de surimi de ronco, croca, lenguado y ratón, a 60 °C durante 0 (control), 20 y 40 min. La reacción se detuvo con la adición de 1,2 mL de disolución SDS al 10% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,5% (v/v), las muestras se homogeneizaron durante 2 min en un agitador Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) y se calentaron a 80 °C hasta solubilizar totalmente la proteína del surimi.

Se siguió el método de electroforesis SDS-PAGE descrito por Laemmli (1970). Se mezclaron 100 mL de la muestra con 400  $\mu$ L de la disolución desnaturante (conteniendo SDS al 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% y glicerol al 20%). Se aplicaron 10  $\mu$ L de cada una de las muestras, conteniendo aproximadamente 10 mg de

proteína/mL, en geles de poliacrilamida al 12%, en un aparato de electroforesis Aldrich/Techware (Sigma, Inc. St. Louis, MO), a 15 mA y a una temperatura de 5 °C (en refrigeración). Los geles se tiñeron usando una solución al 1% de azul de Commassie R-250 en metanol al 40% y ácido acético al 10%, para visualizar las bandas de proteína.

#### Caracterización del tipo de proteasa

Se empleó una modificación de la técnica de Saeki *et al.* (1995). Se incubaron 500 mg de surimi a 60 °C durante 15, 60 y 180 min, empleando como control surimi fresco y surimi incubado a 90 °C durante 15 min. Inmediatamente después se adicionó a cada muestra 10 mL de una disolución de urea 8 M, 2% p/v (SDS) dodecilsulfato de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% v/v, y se homogeneizaron en un Bio-homogeneizador (modelo 133/1281-0, Biospec Products Inc, Bartlesville, OK., USA) antes de incubarse a 90 °C durante 5 min. Para caracterizar el tipo de proteasa se emplearon inhibidores 5 mM (Sigma Chemical, Co. St. Louis, MO). Para las serín-proteasas PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro disuelto en DMSO), TLCK (tosil lisin clorometil cetona disuelto en HCl 0,1N) y TPCK (tosil fenilalanin clorometil cetona disuelto en etanol); y para cisteín-proteasas PCMB (ácido *p*-hidroxi-mercuribenzoico en NaOH 0.5N), E-64 (*trans*- epoxisuccinil-L-leucilamido-(4 guanidino) butano en agua desionizada) y cistatina (en agua desionizada). A cada muestra de surimi fresco (500 mg) se le adicionaron 50 mL de inhibidor y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente (20-25 °C) para permitir la acción del inhibidor. Posteriormente las muestras se incubaron a 60 °C durante 3 h. Se empleó el método de electroforesis previamente descrito. En la preparación de la muestra a inyectar, se mezclaron 100  $\mu$ L de la muestra con 600  $\mu$ L de solución desnaturizante (conteniendo azul de bromofenol 0,001%, SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y glicerol al 10%). Se inyectaron en cada carril 10  $\mu$ L de muestra, conteniendo aproximadamente 1 mg/mL de proteína en geles de poliacrilamida al 7%.

#### Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza ( $P < 0.05$ ) de los resultados analíticos de las muestras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie con mayor contenido en proteína fue el pez ratón con un 15,72%, mientras que en las otras especies fue alrededor de un 14%. El pez soldado presentó el más bajo contenido de humedad (74%) y la croca el más alto (81%, Tabla 1). No se encontró una asociación entre

**Tabla 1.** Contenido de humedad y proteína de los surimis.

**Table 1.** Moisture and protein content of surimis.

Especie	Humedad (%)	Proteína (%)
Croca	81 $\pm$ 2.3	14.53 $\pm$ 0.08
Ronco	78 $\pm$ 2.1	14.01 $\pm$ 0.08
Lenguado	78 $\pm$ 1.6	14.21 $\pm$ 0.08
Ratón	78 $\pm$ 2.5	15.72 $\pm$ 0.08
Soldado	74 $\pm$ 1.8	14.21 $\pm$ 0.08

el contenido de humedad y proteínas y las propiedades mecánicas de los geles.

#### Efecto de la temperatura sobre las propiedades mecánicas

La disminución en los valores de esfuerzo de cizallamiento por efecto de la incubación a 60 °C indicó que el fenómeno modori se produjo en las cinco especies estudiadas (Figura 1). El cambio fue significativo ( $P < 0.05$ ) desde los 20 min y tendió a ser mayor a los 40 min en todas las especies. Los peces ratón y ronco fueron las especies más afectadas desde los 20 min de incubación a 60 °C, con una disminución del 52% y 40% del valor inicial, respectivamente. La croca, el soldado y el lenguado mostraron menor susceptibilidad al modori (24, 24 y 36% de pérdida, respectivamente).

Los resultados obtenidos en los geles de surimi para la deformación al corte (Figura 2) muestran que el ratón fue la especie más afectada, con una pérdida del 45% a los 20 min. En las demás especies, la disminución varió del 15 al 22% en ese mismo período. Los resultados descritos señalan la importancia del modori, ya que en un corto período, se puede inducir una fuerte pérdida en la estructura del gel, dependiendo de la especie, tal y como lo han observado otros autores. En geles de lacha del Atlántico (*Brevortia tyrannus*), después de 20 minutos de incubación a 60 °C, se pierde un 50% de la dureza del gel (Boye y Lanier, 1988), mientras que, los geles de carpa (*Cyprinus carpio*) pierden 50% de la fuerza relativa del gel, al incubarlos una hora a 60 °C (Makinodan *et al.*, 1985). En ambos trabajos, se encontró que la pérdida estructural sólo se producía en el intervalo de 50 a 70 °C y que el deterioro aumentaba por efecto del tiempo de incubación, lo que apoya la hipótesis de que el fenómeno modori se asocia con la actividad proteolítica.

#### Actividad proteolítica

Los surimis de las cinco especies estudiadas mostraron una actividad proteolítica a 60 °C en ausencia de sal (Figura 3), o con la adición de 2,5% de sal (Figura 4). En ambos casos el lenguado fue la especie con una mayor actividad proteolítica. En general, se obtuvo menor

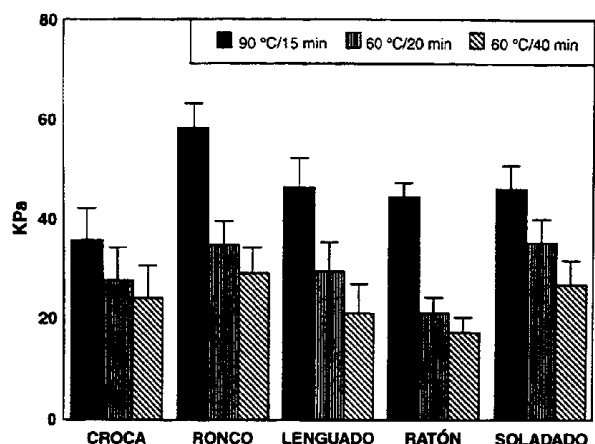


Figura 1. Efecto de la incubación a 60 °C en el esfuerzo de cizallamiento de geles de surimi.

Figure 1. Effect of incubation at 60 °C on the shear stress of surimi gels.

actividad proteolítica en las muestras conteniendo sal (Figura 4) con respecto a las que no lo contenían (Figura 3). Niwa (1992) observó que la presencia de 0,6 M de NaCl reducía la actividad proteolítica, en tanto que Makinodan *et al.* (1985) encontraron que la adición de 3% de sal (0,5 M) reducía del 70 al 80% la actividad proteolítica *in vitro* de un extracto enzimático obtenido de roncador blanco (*Sciaenops ocellatus*) con actividad a 60 °C y pH 8,0. Sin embargo, estos autores han sugerido que la proteasa es más estable al efecto de la sal en la pasta solubilizada que en estudios *in vitro*. La disminución de las propiedades mecánicas de los geles

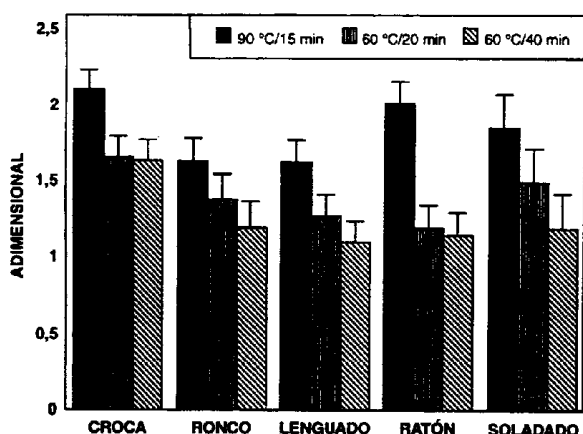


Figura 2. Efecto de la incubación a 60 °C en la deformación de cizallamiento de geles de surimi.

Figure 2. Effect of incubation at 60 °C on the shear strain of surimi gels.

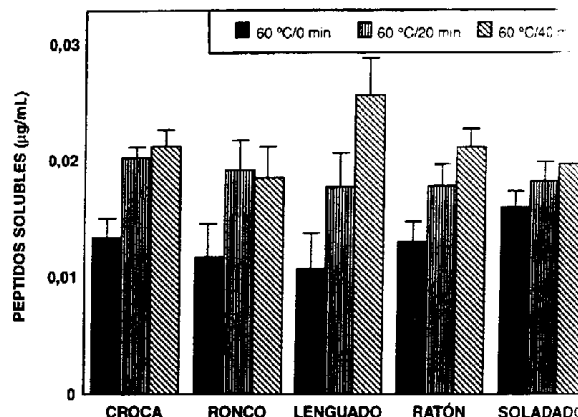


Figura 3. Efecto de la incubación a 60 °C en la actividad proteolítica de surimi de pescado en ausencia de sal determinada como péptidos solubles en ácido tricloroacético.

Figure 3. Effect of the incubation at 60 °C on proteolytic activity of fish surimi in the absence of salt, determined as soluble peptides in trichloroacetic acid.

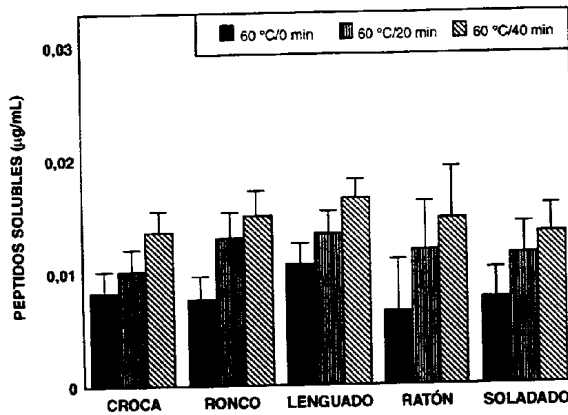
incubados a 60 °C coincidió con la actividad proteolítica *in vitro* (Figuras 5 a y b).

#### Proteólisis por electroforesis SDS-PAGE

La proteólisis *in vitro* (Figura 6) coincidió con los cambios en el patrón electroforético de cuatro de las cinco especies estudiadas (el soldado no se analizó, por falta de muestra en esta etapa). La incubación de los surimis a 60 °C durante 0 (control), 20 y 40 min, provocó la pérdida de intensidad de la banda de miosina, proteína responsable del fenómeno de gelificación en sistemas musculares (Yongsawatdigul *et al.*, 1995). El pez ratón y el lenguado mostraron la mayor pérdida en la intensidad de la banda de miosina. La banda de actina permaneció estable durante dicho periodo, lo que sugiere que las proteasas asociadas con el modori no la reconocen como sustrato. Estos resultados coinciden con los encontrados por Morrissey *et al.* (1993), Yongsawatdigul *et al.* (1995) y Jiang *et al.* (1997), quienes observaron que el principal sustrato para las proteasas asociadas con el modori es la miosina, con mínimo efecto sobre la actina.

#### Determinación del tipo de proteasas relacionadas a el fenómeno modori

El gel de surimi tiene un pH cercano a 7, por lo que cualquier proteasa asociada con la inducción de este fenómeno debe mostrar una cierta eficacia proteolítica a este pH. Aunque inicialmente el fenómeno modori se asoció con la presencia de una proteasa alcalina (Niwa,



**Figura 4.** Efecto de la incubación a 60 °C en la actividad proteolítica de surimi de pescado en presencia de 2,5% de sal, determinada como péptidos solubles en ácido tricloroacético.

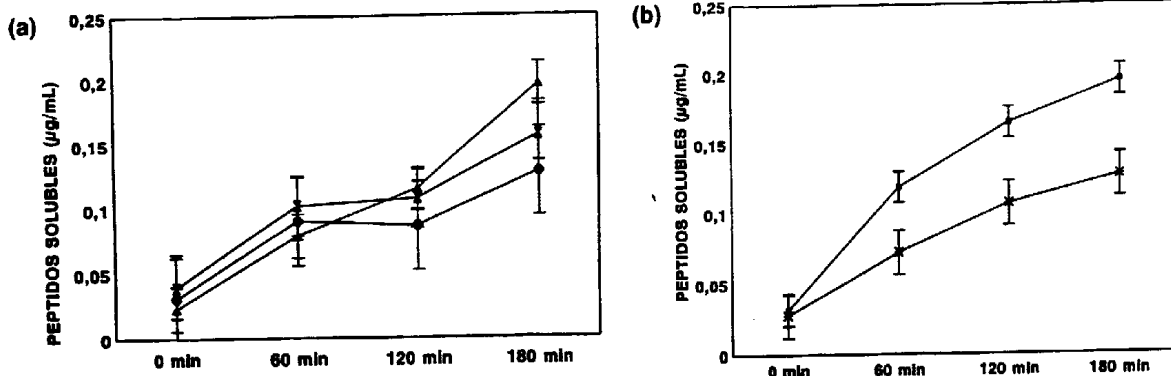
**Figure 4.** Effect of the incubation at 60 °C on proteolytic activity of fish surimi in presence of 2.5% salt, determined as soluble peptides in trichloroacetic acid.

1992), actualmente se asocia con la actividad de otras proteasas, principalmente catepsinas. Las catepsinas tienen su actividad óptima a pH ácido, por lo que suelen ser consideradas como ácido-proteasas (Ashie y Simpson, 1997; Agarwal, 1990). Sin embargo, las catepsinas B, H y L del pescado son cisteín-proteasas (An *et al.*, 1996; Agarwal, 1990) que se asocian con el fenómeno modori. Las catepsinas B y L tienen actividad a pH neutro (Kolodziejska y Sikorski, 1997), se han encontrado en jurel (*Scomber australasicus*) y se inhiben

con el E-64, que es un inhibidor de cisteín-proteasas (Jiang *et al.*, 1997).

La incubación del surimi de croca, ronco y lenguado a 60 °C durante 3 horas, provocó una fuerte reducción en la intensidad de la banda de miosina en geles de electroforesis (Figuras 7 y 8; carril 6). Sin embargo, la adición de inhibidores del tipo cisteín-proteasa (PHMB, E-64 y cistatina), permitió inhibir parcialmente la proteólisis, que se reflejó en la presencia de la banda de miosina (Figura 7; carriles 7, 8 y 9). Estos resultados indican que en la proteólisis asociada con el fenómeno modori de las tres especies participan enzimas del tipo cisteín-proteasas. De acuerdo con la literatura, podrían ser catepsinas B, H o L (An *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 1997).

Por otra parte, la adición de inhibidores de serín-proteasas, como el PMSE, el TLCK (específico para proteasas tipo tripsina) y el TPCK (específico para proteasas tipo quimotripsina), también evitaron la disminución de la banda de miosina (Figura 8; carriles 7, 8 y 9). Indicando la presencia de serín-proteasas, pueden ser tanto del tipo tripsina como del tipo quimotripsina. Aunque las serín-proteasas y en especial las de tipo tripsina o quimotripsina se asocian con el sistema digestivo de los pescados, su presencia se ha observado en músculo de pescado por diferentes autores. Kolodziejska y Sikorski (1997) citan la presencia de una enzima del tipo tripsina, con una actividad óptima a pH entre 6-8 y a una temperatura de 60 °C, en besugo (*Nemipterus japonicus*) merluza (*Merluccius productus*), carpa (*Carassius auratus* Cuvieri), anchoveta (*Anchoa sp.*) y roncador blanco (*Micropogon opercularis*) capaz de hidrolizar la miosina. Lugo-Sánchez *et al.* (1997) encontraron una proteasa del tipo quimotripsina en el fluido sarcoplásmico de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*).



**Figura 5.** Actividad proteolítica *in vitro* a 60 °C de extractos crudos de surimi, con caseína al 2% (pH 7.5) como sustrato. a. (Δ) croca, (●) ronco y (▲) lenguado. b. (\*) pez ratón, (■) pez soldado.

**Figure 5.** Proteolytic activity at 60 °C in raw extracts of surimi employing 2% casein (pH 7.5) as substrate. a. (Δ) Atlantic croaker, (●) barred grunt, and (▲) sole. b. (\*) northern kingfish and (■) striped searobin.

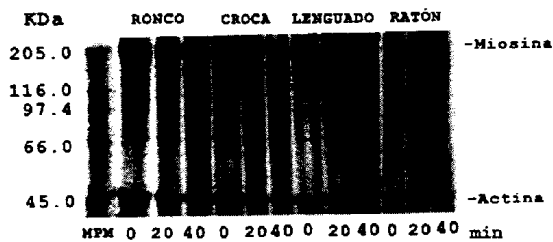


Figura 6. Gel de electroforesis de las especies ronco, croca, lenguado y pez ratón incubadas durante 0, 20 y 40 min a 60 °C.

Figura 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of barred grunt, Atlantic croaker, sole and northern kingfish fish species, incubated at 60 °C for 0, 20 and 40 min.

El empleo de suero quesero, proteína de plasma de bovino (BPP) y extracto de papa, adicionados al 1-2% en surimi de blanco del Pacífico (*Merluccius productus*) inhibieron la proteólisis en el surimi y mejoraron la fuerza de gel de muestras obtenidas a 60 °C (Morrissey *et al.*, 1993). Estos aditivos contienen inhibidores de proteasas no específicos, por lo que son de acción general. Por otra parte, el empleo de inhibidores específicos para cisteín-proteasas (E-64 y leupeptina) inhibieron la proteólisis de la miosina en surimi de salmón y mejoraron su fuerza de gel.

**SYNOPSIS**

The textural characteristics of the surimi gels depend on the temperature at which fish pastes are exposed. When the pastes are subjected to temperatures < 40 °C,

an elastic and low cohesion gel called suwari is obtained if they are subjected to temperatures near 60 °C a fragile gel called modori is formed. At temperatures higher than 70 °C kamaboko gels are obtained. Kamaboko gel has good cohesivity and elasticity attributes (Niwa 1992).

The modori phenomenon implicates structural disintegration of the gel and is associated with proteolytic activity between 50 and 70 °C (An *et al.*, 1994 Yongsawatdigul *et al.*, 1995). The relationship between protease activity and the modori phenomenon depends on the fish species (Matsumoto and Noguchi, 1992). The objective of this work was to study the presence of the modori phenomenon in five fish species from the Gulf of Mexico.

Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*), barred grunt (*Conodon nobilis*), sole (*Cyclopsetta chittendeni*), northern kingfish (*Menticirrhus saxatilis*) and striped searobin (*Prionotus evolans*) were captured in the Gulf of Mexico. Surimi was prepared from these fish species in a similar way by three washing-dewatering steps with a 3:1 water/muscle ratio. Sucrose 8% (w/w) was added to each surimi as a cryoprotectant prior to frozen storage as blocks. Surimi gels were obtained by mixing each partially thawed block with 2.5% (w/w) NaCl and enough iced-water to adjust the moisture/protein ratio to a constant 6:1 value. Gels were obtained by incubating the surimi sols packed into stainless steel tubes at 60 °C for 0 (control), 20 or 40 min prior to full heating at 90 °C/15 min. Cylindrical gels were cut into 3 cm lengths and molded into a capstan shape with a minimum diameter at the center of 1cm. Shear stress and strain at failure were measured by a torsion test using a Brookfield viscometer with a special fixture (Montejano and Morales, 1991).

An enzymatic extract was obtained from each surimi and the enzymatic activity of each crude extract was

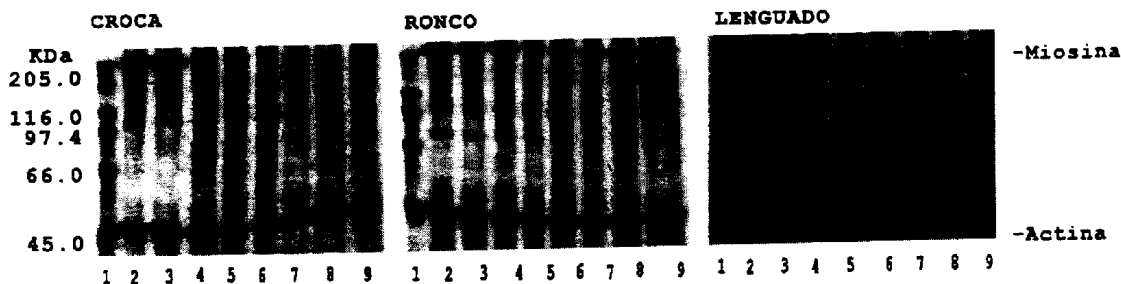
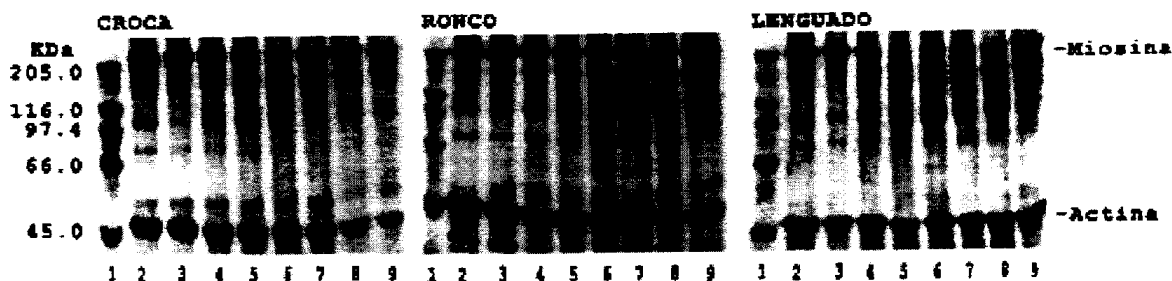


Figura 7. Efecto de los inhibidores en las cistein-proteasas del surimi. Carriles: 1. Marcador de peso molecular SDS-6H. 2. Control (surimi congelado). 3. 90 °C/15 min. 4. 60 °C/15 min. 5. 60 °C/1 h. 6. 60 °C/3 h. 7. PHMB 60 °C/3 h. 8. E-64 60 °C/3 h. 9. Cistatina 60 °C/3 h.

Figure 7. Effect of the inhibitors on cysteine-proteases in surimi. Line: 1. marker weight of molecular SDS-6H; 2. control (frozen surimi); 3. 90 °C/ 15 min; 4. 60 °C/ 15 min; 5. 60 °C/ 1 h; 6. 60 °C/ 3 h; 7. PHMB 60 °C/ 3 h; 8. E-64 60 °C/ 3 h; 9. cystatin 60 °C/ 3 h.



**Figura 8.** Efecto de los inhibidores en las serin-proteasas del surimi. Carriles: 1. Marcador de peso molecular SDS-6H; 2. control (surimi congelado). 3. 90 °C/15 min. 4. 60 °C/15 min. 5. 60 °C/1 h. 6. 60 °C/3 h. 7. PMSF 60 °C/3 h. 8. TLCK 60 °C/3 h. 9. TPCK 60 °C/3 h.

**Figure 8.** Effect of inhibitors for the serine-proteases in surimi. Line: 1. Marker weight of molecular SDS-6H. 2. control (frozen surimi); 3. 90 °C/ 15 min; 4. 60 °C/ 15 min; 5. 60 °C/ 1 h; 6. 60 °C/ 3 h; 7. PMSF 60 °C/ 3 h; 8. TLCK 60 °C/ 3 h; 9. TPCK 60 °C/ 3 h.

evaluated using casein as substrate and incubating at 60 °C for 0, 60, 120 or 180 min. To determine proteolysis, soluble peptides in trichloroacetic acid (TCA) were measured at 595 nm, employing Bradford's reagent (Robyt and White, 1990).

The presence of proteolysis and the protease type was determined by electrophoresis (SDS-PAGE; Laemmli, 1970); 500 mg of each surimi were incubated at 60 °C for 15, 60 or 180 min. Fresh surimi incubated at 90 °C for 15 min was used as a control. 10 mL of a solution containing urea 8 M, 2% SDS and 2% of 2-mercaptoethanol were added. The samples were homogenized and incubated at 90 °C for 5 min (Saeki *et al.*, 1995). The following inhibitors were used at concentrations of 5 mM. For serine-proteases: phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), *p*-tosyl-lysyl chloromethyl ketone (TLCK) and *p*-tosyl-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), and for cysteine-proteases: *p*-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB), *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) and cystatin.

Northern kingfish (*Menticirrhus saxatilis*) had the highest content of protein (15.72%), while the other species presented around 14%. Striped searobin (*Prionotus evolans*) presented the lowest moisture content (74%, Table 1). An association between the chemical composition and mechanical properties (Figures 1 and 2) was not found.

The five fish species showed up the modori phenomenon as a decrease in shear stress (Figure 1) and shear strain (Figure 2) as a function of the incubation time at 60 °C. Changes observed at the 20 min were significant ( $p < 0.05$ ), and increased after 40 minutes in all the species. Shear stress was the parameter most affected (Figure 1), especially for northern kingfish and croaker.

All the fish showed a decrease in shear strain during incubation at 60 °C (Figure 2). Northern kingfish (*Menticirrhus saxatilis*) was the most affected, decreas-

ing 45% for this parameter at 20 min, whereas the remaining fish species lost 15–22% of the original values in the same time. These results showed that modori induces a strong loss of mechanical properties of fish gels in a short period of time.

Although proteolytic activity was present in all the fish for both levels of salt, 0 or 2.5% (Figures 3 and 4), samples containing 2.5% salt showed the lowest values of proteolysis. In this respect Niwa (1992) suggested that the presence of 0.6 M salt inhibited the proteolytic activity related with modori. Sole (*Cyclosetta chittendeni*) always presented the highest values of proteolytic activity.

Loss of mechanical properties of gels incubated at 60 °C agreed with the presence of proteolytic activity at such temperature (Figures 5a and b) and myosin degradation (Figure 6). Makinodan *et al.* (1985) and Boye and Lanier (1988) found the maximum activity at 60 °C, whereas texture showed its minimum in white croaker (*Sciaenops ocellatus*) and Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) gels. Morrissey *et al.* (1993) and Jiang *et al.* (1997) reported that myosin was the main substrate for proteases associated with modori.

Myosin proteolysis was inhibited by both serine- and cysteine-proteases inhibitors (Figures 7 and 8), indicating the presence of both kind of proteases. Cysteine-proteases have been widely reported in the literature as being responsible for the modori phenomenon (An *et al.*, 1996). Recently, the presence of serine-proteases in fish muscle, especially trypsin-like and chymotrypsin-like proteases, has been reported (Kolodziejska and Sikorski, 1997; Lugo-Sánchez *et al.*, 1997).

Texture degradation of surimi gels from tropical fish species was associated with proteolytic activity involving myosin hydrolysis. Proteolysis of myosin by muscle proteases is the responsible for the low gelling capacity attributes of surimi from studied fish. This phenomenon was induced by both serine- and cysteine-proteases.



## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Técnico María de los Angeles Navarrete del Toro (CIBNOR) su valiosa contribución en el desarrollo del presente trabajo. Se agradece al CONACYT SIREYES el apoyo para la realización del presente estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- An H., Seymour T.A., Wu J.W. y Morrissey M.T. (1994). Assay systems and characterization of pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. *Journal of Food Science* 59: 277-281.
- An H., Peters M.Y. y Seymour T.A. (1996). Roles of endogenous enzymes in surimi gelation. *Trends in Food Science and Technology* 7: 321-326.
- Agarwal S.K. (1990). Proteases cathepsins -a view. *Biochemical Education* 18(2): 67-72.
- AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis*. 13<sup>th</sup> edn. Washington, D.C: Association of Official Analytical Chemists.
- Ashie I.N.A. y Simpson B.K. (1997). Proteolysis in food miosystems - a review. *Journal of Food Biochemistry* 21: 91-123.
- Boye S.W. y Lanier T.C. (1988). Effect of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on Surimi gels. *Journal of Food Science* 53: 1340-1398.
- Busconi L., Folco E.J., Martone R.E. y Sánchez J.J. (1984). Identification of two alkaline proteases and trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). *FEBS* 176: 211-214.
- Deng J.C. (1981). Effect of temperature on fish alkaline protease, protein interaction and texture quality. *Journal of Food Science* 46: 62-65.
- García-Carreño F.L., Navarrete A., Díaz-López M., Hernández-Cortés P. y Ezquerro M. (1995). Proteinase inhibition of fish muscle enzymes using legume seed extracts. *Journal of Food Protection* 59 (3): 312-318.
- Jiang S.T., Lee B.L., Tsao C.H. Y., y Lee J.J. (1997). Mackerel cathepsins B and L effects on thermal degradation of surimi. *Journal of Food Science* 62 (2): 310-315.
- Kolodziejka I. y Sikorski Z.E. (1997). Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates - a review. *Journal of Food Biochemistry* 20: 349-363.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lin, T.S. y Lanier, T.C. 1980. Properties of alkaline protease from the skeletal muscle of Atlantic croaker. *Journal of Food Biochemistry* 4: 17-28.
- Lugo-Sánchez M.E., Pacheco-Aguilar R. y Yépez-Plascencia G. (1997). Catalytic activities of crude enzyme fraction from monterey sardine. *Journal of Food Science* 62 (5): 976-979.
- Makinodan Y., Toyohara H. y Niwa E. (1985). Implication of muscle alkaline proteinase in the textural degradation of fish meat gel. *Journal of Food Science* 50: 1351-1355.
- Matsumoto J.J. y Noguchi S.F. (1992). Cryostabilization of protein in surimi. En: Lanier T.C. and Lee C.M. (eds), *Surimi Technology* New York: Marcel Dekker, Inc. pp 23-40.
- Montejano J.G. y Morales O.G. (1991). Variación en atributos de calidad de surimi individuales elaborados a partir de trucha sardina, lenguado, lisa, jingüaro y carpa. *Biotam* 2: 9-18.
- Montejano J.G., Hernández V.E., y Morales O.G. (1997). Effect of frozen storage of fish muscles and use of five heating processes upon the rheological properties of surimi gels from two species. En: 1997 IFT Annual Meeting Book of Abstracts. Paper 69F-13.
- Morales O.G., Hernández L.E., Montejano J.G. y Díaz R. (1995). Efecto del liofilizado sobre propiedades reológicas de geles de surimi de ronco y lenguado reconstituidos a tres niveles de humedad: proteína. *Biotam* 7: 1-8.
- Morales O.G., Montejano J.G., Hernández V.E. y Fernández R. (1996). Effect of dried beef plasma on the gel strength and deformability of surimi gels from two fish species. En: 1996 IFT Annual Meeting. Book of Abstracts. Paper 80D-12. pp 195-196.
- Morrissey M.T., Wu W.J., Lin D. y An H. (1993). Proteases inhibitor effects on torsion measurements and autolysis of pacific whiting surimi. *Journal of Food Science* 58: 1050-1054.
- Niwa, E. (1992). Chemistry of surimi gelation. In: *Surimi Technology*. En: Lanier T.C. and Lee C.M. (eds), *Surimi Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp 389-427.
- Robyt J.F. y White B.J. (1990). *Methods for determining biological molecules. Biochemical Techniques, theory and practice*. Illinois: Waveland Press.
- Saeki H., Iseya Z., Sugiura S. y Seki N. (1995). Gel forming characteristics of frozen surimi from chum Salmon in the presence of protease inhibitors. *Journal of Food Science* 60: 917-921.
- Shimizu Y., Machida R. y Takenami S. (1981). Species variations in the gel-forming characteristics of fish meat paste. *Nippon Suisan Gakkaishi* 47: 95-104.
- Su H., Lin T.S. y Lanier T.C. (1981). Investigation into potential sources of heat-stable alkaline protease in mechanically separated Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*). *Journal of Food Science* 46: 1654.
- Wasson D.H., Babbitt J.K. y French J.S. (1992). Characterization of a heat stable protease from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1: 167-182.
- Yongsawatdigul J., Park J.W., Dagga Y.A. y Kolbe E. (1995). Ohmic heating maximizes gel functionality of Pacific whiting Surimi. *Journal of Food Science* 60: 10-14.