

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA- UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS-CAV
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL

ANDRÉ FERNANDO NASCIMENTO GONÇALVES

**HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERA RESIDUAL DE SARDINHA NA ALIMENTAÇÃO
DE TRUTAS ARCO-ÍRIS**

**LAGES
2019**

ANDRÉ FERNANDO NASCIMENTO GONÇALVES

**HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERA RESIDUAL DE SARDINHA NA ALIMENTAÇÃO
DE TRUTAS ARCO-ÍRIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciência Animal, na Universidade do Estado
de Santa Catarina, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciência Animal
Orientador: Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez
Fabregat
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti

**LAGES
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Gonçalves, André Fernando Nascimento
Hidrolisados proteicos de víscera residual de sardinha na
alimentação de trutas arco-íris / André Fernando Nascimento
Gonçalves. -- 2019.
111 p.

Orientador: Thiago El Hadi Perez Fabregat
Coorientador: Marcos Luiz Pessatti
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2019.

I. Hidrolisado. 2. Autólise. 3. Palatabilidade. 4. *Oncorhynchus mykiss*. 5. *Sardinella*. I. Fabregat, Thiago El Hadi Perez. II. Pessatti, Marcos Luiz. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

ANDRÉ FERNANDO NASCIMENTO GONÇALVES

**HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERA RESIDUAL DE SARDINHA NA
ALIMENTAÇÃO DE TRUTAS ARCO-ÍRIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador: _____
Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat
(Universidade do Estado de Santa Catarina)

Membro: _____


Dr. José Luiz Pedreira Mourão
(Universidade Federal de Santa Catarina)
Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Aquicultura

Membro: _____

Dr. Rafael Lazzari
(Universidade Federal de Santa Maria)

Membro: _____

Dr. Diogo Luiz de Alcântara Lopes
(Universidade do Estado de Santa Catarina)

Membro: _____

Dr. Everton Skoronski
(Universidade do Estado de Santa Catarina)

Lages, 28 de fevereiro de 2019

À minha família...

(Pelo apoio incontestável)

...Rosemeire e Salatiel

Andressa e Ivo

Alexandre

Nicole...

... Dedico

RESUMO

Gonçalves, André Fernando Nascimento. **Hidrolisados proteicos de víscera residual de sardinha na alimentação de trutas arco-íris** 2019. 111 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC), Lages, SC, 2019.

Os hidrolisados proteicos são produtos obtidos da ação de enzimas proteolíticas através da quebra das proteínas. Pode ocorrer um aumento da digestibilidade, resultando em peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres. A escolha da protease hidrolítica depende do custo da enzima e do resultado final desejado após a hidrólise. As enzimas têm diferentes especificidades para clivar as ligações peptídicas, alterando o perfil de peptídeos e aminoácidos, interferindo na qualidade e eficiência do hidrolisado obtido. O presente trabalho é composto por três estudos, com o propósito de desenvolver e caracterizar hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha (*Sardinella* sp.) e sua influência na alimentação de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). O primeiro estudo consistiu em desenvolver e caracterizar um hidrolisado proteico de vísceras de sardinha produzido com as enzimas do próprio trato digestivo do animal. Foram testados diferentes pHs, temperaturas e tempo de hidrólise. As características adequadas para a produção de hidrolisado que economizam tempo, reagente e trabalho são pH 8,4, incubação de 4 horas com uma temperatura de 42 °C. O segundo estudo objetivou caracterizar e comparar o hidrolisado produzido com enzima endógena de sardinha com hidrolisados produzidos com as enzimas comerciais Protamex® e pepsina suína. Foi observado que a caracterização dos hidrolisados foi influenciada pelo tipo da enzima utilizada. A quantidade de nutrientes e o perfil de aminoácidos dos três hidrolisados indicam que eles podem ser utilizados na aquicultura. As enzimas endógenas produziram um hidrolisado com maiores quantidades de aminoácidos hidrofóbicos livres e peptídeos de baixo peso molecular. A enzima Protamex® produziu um hidrolisado com um perfil de peptídeos mais equilibrado. Nas condições produzidas, os hidrolisados inibiram o crescimento de bactérias lácticas. O terceiro estudo teve como intuito utilizar estes três hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha na alimentação de trutas arco-íris. As ferramentas de avaliação foram o desempenho produtivo, a dinâmica das reservas energéticas teciduais, o perfil de metabólitos no sangue, a atividade das vias metabólicas hepáticas e as enzimas digestivas. Foram utilizados 300 juvenis de trutas arco-íris, divididos em 20 caixas de polietileno com capacidade para 100 L. de água, resultando em 15 juvenis de truta arco-íris por unidade experimental. O ensaio teve a duração de 56 dias. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo realizado ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). As dietas contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex® e as dietas contendo hidrolisado produzido com pepsina suína, não diferiram ($P > 0,05$) da dieta controle, proporcionando os melhores resultados de ganho de peso. A dieta controle foi a mais consumida pelas trutas. Foi observado que o hidrolisado produzido com enzimas endógenas de sardinha é pouco palatável, tendo prejudicado o crescimento dos animais. As diferenças relacionadas às reservas energéticas, parâmetros sanguíneos e síntese de aminoácidos, podem ter sido influenciados pelo consumo. A enzima Protamex® e a pepsina suína produziram hidrolisados que estimularam as proteases alcalinas totais. Foi constatado que as vísceras de sardinha hidrolisadas por enzimas comerciais ou pelas enzimas endógenas produzem ingredientes com características promissoras. Porém, estudos para retirada do amargor dos hidrolisados necessitam ser investigados.

Palavras-chave: Hidrolisado. Autólise. Palatabilidade. *Oncorhynchus mykiss*. *Sardinella*

ABSTRACT

Gonçalves, André Fernando Nascimento. **Protein hydrolysates of residual sardine viscera in rainbow trout feeding** 2019. 111 s. Thesis (Doctorate in Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Agroveterinary Science Center (UDESC/CAV), Lages, SC, 2019.

Protein hydrolysates are products obtained from the action of proteolytic enzymes through the breakdown of proteins. There may be an increase in digestibility, resulting in peptides of different sizes and free amino acids. The choice of hydrolytic protease depends on the cost of the enzyme and the desired end result after hydrolysis. The enzymes have different specificities to cleave the peptide bonds, altering the profile of peptides and amino acids, interfering in the quality and efficiency of the obtained hydrolyzate. The present work is composed by three studies, with the purpose of developing and characterizing protein hydrolysates of sardine viscera (*Sardinella* sp.) And its influence on the feeding of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The first study consisted of developing and characterizing a protein hydrolyzate of sardine viscera produced with the enzymes of the animal 's own digestive tract. Different pHs, temperatures and hydrolysis time were tested. Suitable characteristics for hydrolyzate production that save time, reagent and work are pH 8.4, incubation of 4 hours with a temperature of 42°C. The second study aimed to characterize and compare the hydrolyzate produced with endogenous sardine enzyme with hydrolysates produced with the commercial enzymes Protamex® and porcine pepsin. It was observed that the hydrolyzate characterization was influenced by the type of enzyme used. The amount of nutrients and the amino acid profile of the three hydrolysates indicate that they can be used in aquaculture. Endogenous enzymes produced a hydrolyzate with higher amounts of free hydrophobic amino acids and low molecular weight peptides. The enzyme Protamex® produced a hydrolyzate with a more balanced peptide profile. Under the conditions produced, the hydrolysates inhibited the growth of lactic acid bacteria. The third study aimed to use these three protein hydrolysates of sardine viscera in the feeding of rainbow trout. The evaluation tools were the productive performance, the dynamics of the tissue energy reserves, the profile of metabolites in the blood, the activity of the hepatic metabolic pathways, and the digestive enzymes. 300 juveniles of rainbow trout were used, divided into 20 polyethylene boxes with capacity for 100 L of water, resulting in 15 juveniles of rainbow trout per experimental unit. The assay lasted for 56 days. The experimental design was completely randomized with four treatments and five replications. The analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using the tukey test (5%). The diets containing hydrolyzate produced with Protamex® enzyme and the diets containing hydrolyzate produced with porcine pepsin did not differ ($P > 0.05$) from the control diet, providing the best results of weight gain. The control diet was the most consumed by trout. It was observed that the hydrolyzate produced with endogenous sardine enzymes is poorly palatable, having a detrimental effect on the growth of the animals. Differences related to energy reserves, blood parameters and amino acid synthesis may have been influenced by consumption. The enzyme Protamex and porcine pepsin produced hydrolysates

Keywords: Hydrolyzed. Autolysis. Palatability. *Oncorhynchus mykiss*. *Sardinella*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

- Figura 1** - Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em diferentes pHs32
- Figura 2** - Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em pHs alcalinos 32
- Figura 3** - Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha diferentes temperaturas.....33
- Figura 4** - Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em diferentes tempos.....33

Capítulo 3

- Figura 1** - Perfil de peptídeos das diferentes frações de hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.50
- Figura 2** - Crescimento de bactérias do gênero *Lactococcus* em diferentes meios contendo hidrolisado proteico de vísceras de sardinha51

Capítulo 4

- Figura 1** - Atividade das proteases alcalinas totais do trato digestório de juvenis de truta arco-íris alimentadas com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de víscera de sardinha.....84

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 1 - Composição bromatológica e grau de hidrólise dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas	47
Tabela 2 - Composição de aminoácidos dos hidrolisados (% de material seco)	48
Tabela 3 - Composição de aminoácidos livres dos hidrolisados (% de material seco) ..	49
Tabela 4 - Perfis de peptídeos das diferentes frações de hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas	51

Capítulo 4

Tabela 1 - Composição bromatológica e grau de hidrólise dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas	74
Tabela 2 - Composição de aminoácidos livres dos hidrolisados (% de material seco) ..	74
Tabela 3 - Perfis de peptídeos dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas	75
Tabela 4 - Composição das dietas experimentais	76
Tabela 5 - Composição calculada dos aminoácidos (% de PB da dieta) das dietas experimentais. Requisitos de aminoácidos da truta arco-íris (HARDY, 2002)*	77
Tabela 6 - Médias dos parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.....	80
Tabela 7 - Hematologia de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha	81
Tabela 8 - Bioquímica sanguínea de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha	81
Tabela 9 - Reservas energéticas teciduais de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha	82
Tabela 10 - Atividade das enzimas metabólicas de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha	83

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	HIDROLISADO PROTEICO	19
2.1.1	Hidrólise enzimática	20
2.1.2	Hidrólise endógena	22
2.2	HIDROLISADO NA ALIMENTAÇÃO DE SALMONÍDEOS	24

3 CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO AUTOLÍTICO DE VÍSCERAS INDUSTRIAIS DE SARDINHA (*Sardinella sp.*)

RESUMO.....	27	
3.1	INTRODUÇÃO	28
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1	Obtenção e caracterização das vísceras de sardinha.....	29
3.2.2	Preparação das amostras	29
3.2.3	Efeito do pH.....	30
3.2.4	Efeito da temperatura	30
3.2.5	Efeito do tempo	30
3.2.6	Grau de hidrolise	31
3.2.7	Análise estatística.....	31
3.3	RESULTADOS	31
3.3.1	Efeito do pH.....	31
3.3.2	Efeito da temperatura	32
3.3	Efeito do tempo	33
3.4	DISCUSSÃO	34
3.5	CONCLUSÃO.....	36
	REFERENCIAS.....	37

4 CAPÍTULO 3 – DIFERENTES PROTEASES INFLUENCIAM NA CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERAS INDUSTRIAIS DE SARDINHA (*Sardinella sp.*)

RESUMO.....	41	
4.1	INTRODUÇÃO	42
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.2.1	Elaboração dos hidrolisados proteicos.....	43
4.2.2	Caracterização química e grau de hidrolise	45
4.2.3	Composição de aminoácidos e aminoácidos livres.....	45
4.2.4	Distribuição de peso molecular dos peptídeos.....	45

4.2.5	Avaliação microbiológica	46
4.3	RESULTADOS	47
4.3.1	Caracterização química e grau de hidrolise	47
4.3.2	Composição de aminoácidos e aminoácidos livres.....	47
4.3.3	Distribuição de peso molecular dos peptídeos.....	49
4.3.4	Avaliação microbiológica	51
4.4	DISCUSSÃO	52
4.5	CONCLUSÃO	57
	REFERENCIAS.....	59

5 CAPÍTULO 4 - O TIPO DE ENZIMA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERA DE SARDINHA INFLUENCIA NA PALATABILIDADE DA DIETA, DESEMPENHO PRODUTIVO E NO APROVEITAMENTO DA PROTEÍNA DE JUVENIS DE TRUTAS ARCO-ÍRIS

	RESUMO.....	69
5.1	INTRODUÇÃO	70
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	72
5.2.1	Produção e caracterização dos hidrolisados.....	72
5.2.2	Dietas experimentais.....	75
5.2.3	Manejo da unidade experimental.....	77
5.2.4	Parâmetros produtivos.....	77
5.2.5	Coleta de material biológico	78
5.2.6	Análise sanguínea.....	78
5.2.7	Reservas energéticas teciduais.....	79
5.2.8	Metabolismo hepático.....	79
5.2.9	Enzima digestiva – protease alcalina total.....	79
5.2.10	Análise estatística	79
5.3	RESULTADOS	80
5.3.1	Desempenho.....	80
5.3.2	Parâmetros sanguíneos.....	80
5.3.3	Reservas energéticas teciduais.....	82
5.3.4	Enzimas metabólicas	82
5.3.5	Proteases alcalinas totais	83
5.4	DISCUSSÃO	84
5.5	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

A industrialização e o processamento do pescado geram mais de 60% de subprodutos para descarte (DEKKERS, 2011; OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014). O destino adequado e correto destes resíduos é uma das principais problemáticas da cadeia de produção (STORI et al., 2002). O desenvolvimento de técnicas sustentáveis visando à preservação ambiental e o aproveitamento de nutrientes destes resíduos são desafios mundiais (FAO, 2018). Diante disto, o hidrolisado proteico surge como uma alternativa de recuperação destes nutrientes, agregando retorno econômico (CHALAMAIAH et al., 2012).

A sardinha (*Sardinella* sp.) é um gênero distribuído amplamente ao redor do mundo, sendo encontrado em toda extensão do Oceano Atlântico, no oceano Índico e no Pacífico (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Trata-se de um dos principais pescados capturados no mundo (FAO, 2018). A *Sardinella* é a base da cadeia de processamento industrial de enlatados (SANTOS; RODRIGUES-RIBEIRO, 2000; CERGOLE; DIAS-NETO, 2011).

O processo de hidrólise consiste em degradar as proteínas em peptídeos menores, aumentando sua digestibilidade através da utilização de enzimas hidrolíticas (BATISTA, 2011; BERGE; STOREBAKKEN, 1996; CHALAMAIAH et al., 2012). As proteases são enzimas cuja principal função biológica é acelerar a hidrólise (FENNEMA, 1993). Cada tipo de enzima possui particularidades para realização da clivagem das ligações peptídicas (PASUPULETI; BRAUN, 2010). Apresentam certo grau de especificidade de substrato, relacionado aos aminoácidos envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada, sendo que a posição da ligação na cadeia polipeptídica e o tamanho da cadeia influenciam na atividade das proteases (NELSON; COX, 2014). Neste contexto, o tipo de enzima utilizado na elaboração do hidrolisado proteico, juntamente com a qualidade da matéria-prima, pode resultar em diversos tipos de produtos com qualidades e eficiência diferentes (SEE; HOO; BABJIET, 2011).

Existem diversas enzimas proteolíticas que podem ser utilizadas para hidrolisar as proteínas de peixe e gerar os hidrolisados, sendo algumas muito comuns, como a Alcalase, Protamex, papaína, pepsina, tripsina, a-quimotripsina, pancreatina, entre outras (ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). A enzima Protamex® (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) é amplamente utilizada para produção de hidrolisado de diversas espécies (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016;

DUMAY et al., 2009; ENNAAS et al., 2015; NGUYEN et al., 2011; WOSNIAK et al., 2016). Consiste em uma mistura de proteases microbianas, produzida com enzimas de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (KOUAKOU et al., 2014; LIASET et al., 2002). A pepsina é uma das enzimas mais antigas e triviais utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos (NAKAJIMA et al., 2009; NAZEER et al., 2011; RAJARAM; NAZEER, 2010; QARA e NAJAFI, 2018; VIEIRA et al., 1995, VON DER DECKEN et al., 1992).

A utilização de proteases endógenas de vísceras é uma alternativa para reduzir os custos da hidrólise enzimática (MAIZ et al., 2018). O processo autolítico caracteriza-se por depender apenas da ação das enzimas digestivas do próprio peixe, através de uma operação simplificada (SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). Resultados positivos são descritos para a utilização de enzimas endógenas na produção de hidrolisados de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003), bacalhau (*Gadus morhua*) (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005), tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SILVA et al., 2014) e atum-bala (*Auxis rochei*) (MAIZ et al., 2018).

Os peptídeos de pequeno peso molecular presentes nos hidrolisados podem influenciar diretamente na fisiologia do animal, pois são fontes adequadas para a nutrição devido a excelente absorção gastrointestinal, sendo melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres (SIEMENSMA et al., 1993; ZIEGLER et al., 1990). A hidrólise enzimática também pode gerar peptídeos biologicamente ativos (KIM; WIJESSEKARA, 2010). Podem influenciar na hematologia (LORENZ et al., 2018), bioquímica sanguínea (BAE et al., 2019), saúde e imunologia (GISBERT et al., 2018), aproveitamento metabólico (FABREGAT et al., 2016; VENTURIN et al., 2016), morfometria intestinal (WOSNIAK et al., 2016) e microbiologia e excreção de enzimas intestinais (HA et al., 2019).

A truta arco-íris é um dos principais pescados produzidos no mundo (WEBSTER; LIM, 2002). Trata-se de um animal carnívoro criado em sistema intensivo, demandando grande quantidade de proteína animal. Desta forma, a utilização do hidrolisado como ingrediente alternativo, torna-se uma alternativa extremamente interessante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIDROLISADO PROTEICO

Os hidrolisados proteicos são produtos obtidos da ação de agentes químicos ou bioquímicos, através das quais ocorre a degradação das proteínas com consequente aumento da sua digestibilidade resultando em peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (BERGE; STOREBAKKEN, 1996). Os hidrolisados podem ser produzidos, de modo geral, por três métodos: a hidrólise enzimática, a hidrólise alcalina e a hidrólise ácida (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994).

A especificidade da enzima com o substrato, o controle do grau de hidrólise e as condições moderadas de ação, são características positivas da hidrólise enzimática (ZAVAREZE et al., 2009). O processo de hidrólise pode gerar peptídeos biologicamente ativos, que possuem efeitos fisiológicos sobre o organismo, contribuindo para importantes funções vitais (RYAN et al., 2011). Para os hidrolisados proteicos já foram registradas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, agonísticas de opioides, imunomodulatórias e prebióticas (GOOSEN et al., 2014; KARNJANAPRATUM et al., 2016; MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2015; MORALES-MEDINA et al., 2016; ROBERT et al., 2015).

A hidrólise é avaliada pela quantificação do grau de hidrólise, que é definido como a quantidade de ligações peptídicas quebradas da quantidade total de ligações peptídicas da proteína original (ADLER-NISSEN, 1986, BENÍTEZ et al., 2008, HE et al., 2013). O grau de hidrólise está diretamente relacionado com a quantidade de peptídeos de baixo peso molecular (OVISSIPOUR et al., 2009). Esta relação é inversamente proporcional (MAHMOUD et al., 1994) e também relacionada as propriedades bioativas e funcionais dos hidrolisados (KLOMPONG et al., 2007).

O valor nutricional dos hidrolisados, além do grau de hidrólise e do tamanho da cadeia de peptídeos, depende também da matéria-prima ou proteína de origem (CARREIRA et al., 2003). O perfil de aminoácidos de cada matéria-prima é o que determina a qualidade da proteína de origem, e conseqüentemente influenciará no hidrolisado final (ANANTHARAMAN; FINOT, 1993). Comumente as matérias-primas mais utilizadas são as derivadas do leite (caseína, lactoalbumina e proteína do soro), da soja e a do peixe, devido principalmente ao alto valor nutricional, disponibilidade comercial em grandes quantidades e custo moderado (NEVES, 2001).

O hidrolisado de pescado é composto por proteínas de elevado valor biológico, podendo ser utilizadas espécies não comerciais e resíduos da indústria pesqueira (BATISTA, 2011). A composição geral da fração solúvel de um hidrolisado proteico de pescado apresenta de 85 a 90% de proteína, 2 a 4% de lipídios e 6 a 7% de cinzas na matéria seca (HALL; AHMAD, 1992). Estas características permitem que o hidrolisado seja utilizado na composição de dietas para peixes, principalmente em cultivos que exijam ingredientes com proteínas de maior qualidade, como no caso de dietas para peixes carnívoros (HEVROY et al., 2005) e/ou larviculturas (HERMANNDOTTIR et al., 2009).

2.1.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática utiliza enzimas proteolíticas em uma técnica que permite recuperar o valor nutricional e funcional das proteínas presentes na matéria-prima, e não leva à formação de compostos tóxicos no hidrolisado (BATISTA, et al., 2006). A possibilidade de seleção de enzimas proteolíticas auxilia no controle do grau de clivagem das proteínas do substrato. A utilização adequada das proporções destas enzimas com o substrato, dentro de um tempo apropriado de reação, permite a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais (ONODENALORE; SHAHIDI, 1996). A temperatura, tempo de hidrólise e pH, também são parâmetros que determinam o resultado da hidrólise (LAHL; BRAUN, 1994).

As enzimas exógenas mais utilizadas no processo de hidrólise são as proteases como a Alcalase, papaína, pepsina, tripsina, a-quimotripsina, pancreatina, Flavourzyme, pronase, Neutrase, Protamex, bromelina, criotina F, protease N, protease A, Orientase, termolisina, e Validase (HSU, 2010). As enzimas proteolíticas podem ser classificadas como endo e exopeptidases (TORRUCO-UCO et al., 2008). As endopeptidases promovem a quebra de ligações peptídicas no meio das cadeias proteicas, dando origem a peptídeos com maior ou menor massa molecular, exibindo maior atividade funcional, com poucos aminoácidos livres; e as enzimas exopeptidases catalisam a hidrólise de ligações nas extremidades das cadeias polipeptídicas, produzindo muitos aminoácidos livres responsáveis por sabores acentuados e poucos peptídeos (BATISTA, 2011).

A escolha da enzima ideal para a produção de um hidrolisado deve considerar alguns pontos, como a características do produto pretendido, a eficiência da protease, sua disponibilidade no mercado e o seu preço comercial (BATISTA, et al., 2006). As

enzimas microbianas em comparação com as de origem animal ou vegetal, apresentam algumas vantagens, como a estabilidade de pH e temperatura, sendo que algumas enzimas microbianas apresentam ótima atividade com pH 7,0 (HERPANDI et al., 2011), ou seja, não é necessário acrescentar soluções ácidas ou alcalinas durante o processamento.

A pepsina de origem animal apresenta seu ponto ótimo de atuação em um pH ácido, porém este pH ácido leva a diminuição na recuperação proteica e menor valor nutricional, sendo que a hidrólise intensa pode diminuir a funcionalidade do hidrolisado (KRISTINSSON; RASCO, 2000). A grande vantagem é a inibição do crescimento microbiano e o fato da pepsina atuar em uma faixa de pH de 1 a 4, na qual a maioria das enzimas ou proteínas sofre desnaturação (YAMAMOTO, 1975).

Em contrapartida, a enzima Protamex® apresenta boas potencialidades para a produção de hidrolisado proteico (BATISTA, 2011). Trata-se de um complexo de proteases originárias de *Bacillus*. Esta enzima satisfaz as exigências de pureza para as enzimas de qualidade alimentar estabelecidas pela FAO (Expert Committee on Food Additives (JEFTA) and the Food Chemicals Codex (FCC)) e o produto de sua hidrólise não possui amargor (LIASET et al., 2002; LIASET; JULSHAMN; ESPE, 2003; KOUAKOU et al., 2014). Trata-se de uma enzima amplamente utilizado para produção de hidrolisado de diversas espécies, tais como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (LIASET; JULSHAMN; ESPE, 2003); sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) (DUMAY et al., 2009); atum-amarelo (*Thunnus albacares*) (NGUYEN et al., 2011); cavala do Atlântico (*Scomber scombrus*) (ENNAAS et al., 2015); corvina (*Micropogonias furnieri*) (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016); sardinha (*Sardinella sp.*) (WOSNIAK et al., 2016); entre outros.

A comparação entre a utilização da enzima Protamex® (GH 3,36%) e pepsina (GH 3,29%) para hidrolisar o peixe Kilka (*Clupeonella cultriventris caspi*) foi realizada (QARA e NAJAFI, 2018). Os autores relataram que o peso molecular de hidrolisados de peixe produzido com enzima pepsina foi superior ao de hidrolisado produzido com Protamex®, que se encontravam com peso abaixo de 30 kDa. As diferenças foram relatadas mesmo com a utilização da mesma matéria-prima e com GHs semelhantes, demonstrando que estas variações estão relacionadas a escolha da enzima hidrolítica (ALEMÁN et al., 2011).

2.1.2 Hidrólise endógena

Para a produção dos hidrolisados, além da utilização de enzimas exógenas, também podem ser utilizadas enzimas endógenas, como proteases previamente existentes no pescado (CHALAMAIAH et al., 2012). Os produtos obtidos com as proteases endógenas são os autolisados enzimáticos ou ensilados, sendo que neste caso o controle da hidrólise das proteínas é difícil, não garantindo um padrão de qualidade uniforme (BATISTA, 2011). Entretanto, há pesquisas com autólise demonstrando resultados positivos. Silva et al. (2014) produziram hidrolisados de resíduo de carcaça com as enzimas endógenas do trato digestório de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e compararam com a enzima comercial Alcalase®. Os resultados da composição dos hidrolisados foram semelhantes e os autores concluíram que o hidrolisado de tilápia produzido com enzimas endógenas e o hidrolisado produzido com Alcalase, possuem potencial para utilização na produção aquícola.

A autólise também foi avaliada na produção do hidrolisado de vísceras de bacalhau (*Gadus morhua*) (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005). Os autores fizeram uma autólise das vísceras com as enzimas digestivas do trato digestório dos animais e posteriormente acrescentaram enzimas comerciais. A enzima endógena foi suficiente para obter um rendimento de 75% de matéria seca solúvel. A adição das enzimas comerciais resultou em um incremento de 20% no rendimento, resultando em 95% de matéria seca solúvel. Isto demonstra que o rendimento extra obtido pela adição de proteases comerciais é limitado, podendo não ser economicamente viável dependendo do valor investido na compra de enzimas. Resultados positivos também foram encontrados para autólises de resíduo de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003). A enzima endógena foi comparada com a papaína e a pepsina e resultaram em uma hidrólise mais eficiente, após 120 minutos. De acordo com os autores, as enzimas endógenas da raia-lenga, podem substituir as enzimas comerciais devido as suas propriedades positivas.

Produção de hidrolisado proteico de pescado com enzimas endógenas extraídas do trato digestório dos animais e purificadas para a utilização posterior também foram pesquisadas. A tripsina isolada de sardinha (*Sardinella aurita*), a tripsina isolada de smooth hound (*Mustelus mustelus*) e a tripsina de cuttlefish (*Sepia officinalis*) foram utilizadas eficientemente para produzir hidrolisados de vísceras de sardinha e avaliar a atividade antioxidante (BARKIA et al., 2010). A pepsina do trato digestório de truta arco-íris também foi extraída e purificada para a produção de hidrolisados proteicos

(WALD et al., 2016). Foram encontrados efeitos antibacterianos desse hidrolisado contra contaminantes alimentares e patógenos presentes na piscicultura.

O hidrolisado de vísceras de atum-bala (*Auxis rochei*) utilizando suas enzimas endógenas foi produzido por autólise. Esta metodologia foi chamada pelos autores de processo de baixo custo (MAIZ et al., 2018). Avaliaram-se as propriedades funcionais e bioativas dos hidrolisados produzidos em diferentes graus de hidrólise (DH 3%, 6% e 9%). Os hidrolisados enzimáticos endógenos (EH) foram comparados com hidrolisados produzidos com uma enzima comercial chamada subtilisina. O resultado final foi a produção de hidrolisados bioativos com capacidades inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA provoca o relaxamento dos vasos sanguíneos, reduzindo a pressão arterial. O hidrolisado de enzima endógena foi muito semelhante ao hidrolisado de subtilisina nas características solubilidade, emulsificação, análise antioxidante, redução de metais e atividade de eliminação de radicais livres. Experimento semelhante foi realizado com hidrolisados de cabeças e vísceras de sardinha (*Sardinella aurita*) (BOUGATEF ET AL., 2008). Entretanto para a realização da hidrólise foi utilizado extrato enzimático bruto de outra espécie de sardinha (*Sardina pilchardus*) previamente extraído. Os autores concluíram que este hidrolisado possui atividade inibitória da ECA.

A utilização de enzimas endógenas de tilápia para produzir hidrolisados com capacidade microbiológica também foi estudada (DERAZ et al., 2011). O hidrolisado funcionou como meio de cultura para crescimento de bactérias lácticas (*Lactobacillus sake* Lb 706). A temperatura ambiente, pHs de hidrólise abaixo de 6,2 e tempos de hidrólise variando de 8 a 20 horas são indicados pelos autores. O hidrolisado foi equivalente aos meios de cultura comerciais para bactérias lácticas.

O hidrolisado de pescada do pacífico (*Merluccius productus*) também foi investigado e produzido por autólise (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2008). A diferença para com os outros trabalhos é de que a autólise ocorrida foi devido ao parasita *Myxosporea*, *Kudoa paniformis*, naturalmente presente nestes animais. A presença deste micro-organismo parasita faz com que seja inviável o processamento e armazenamento deste peixe para consumo humano devido à autólise natural da musculatura após o abate. Os resultados encontrados demonstram que é possível a utilização desta espécie, sem valor comercial, para a produção de hidrolisados proteicos. Este trabalho, assim como os anteriormente revisados envolvendo autólise, possui a característica de não terem sido testados na alimentação dos animais, possuindo apenas resultados laboratoriais. Existe, portanto, a demanda que sejam testados “in vivo”.

2.2 HIDROLISADOS NA ALIMENTAÇÃO DE SALMONÍDEOS

Visando ampliar o número de trabalhos relevantes na literatura envolvendo a utilização de hidrolisado proteico e produção de trutas arco-íris, esta capítulo incluiu também a utilização de hidrolisados proteicos na alimentação de outros salmonídeos. Neste contexto, uma característica relevante e necessária é o nível de inclusão nas dietas. A substituição da farinha de peixe por hidrolisado proteico de pescado em salmonídeos, geralmente, demonstra um efeito benéfico quando utilizado baixos níveis de incorporação e resulta em uma piora do desempenho animal com inclusões elevadas (HEVROY et al., 2005; REFSTIE et al., 2004). Resultado semelhante foi encontrado para silagem de peixe, sendo indicado o nível de até 15% de inclusão para salmão do atlântico (*Salmo salar*) (ESPE et al., 1999).

Hevroy et al. (2005) analisaram em dietas para salmão do atlântico níveis de inclusão de até 30% de hidrolisado proteico de pescado, utilizando a enzima Alcalase® para realização da hidrólise. Todas as dietas eram isoenergéticas e possuíam a mesma quantidade de aminoácidos. Os autores constataram que animais que consumiram dietas com níveis entre 18 e 24% apresentaram melhores ganhos de peso em comparação a animais que consumiram níveis maiores de inclusão de hidrolisado na dieta, entretanto a retenção de proteínas foi inferior. Sendo assim, a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) nos tecidos de transaminação, não foram alteradas, demonstrando que não ocorreram diferenças no metabolismo proteico de nenhum tratamento. O hidrolisado proteico não prejudicou a saúde dos animais em nenhum nível de inclusão testado.

Em estudo semelhante, foi testado níveis de inclusão de até 36% de hidrolisado proteico na dieta de salmões do atlântico (REFSTIE et al., 2004). Constatou-se que o nível de inclusão de 10 e 15% foi o de melhor desenvolvimento para os animais. A disponibilidade de aminoácidos foi maior em todas as dietas contendo hidrolisado proteico de pescado em comparação com a dieta controle, que possuía ingredientes tradicionais. Esta informação demonstra que animais que consumiram dietas com hidrolisado proteico utilizaram a proteína da dieta mais eficientemente para o crescimento.

Os subprodutos do atum foram hidrolisados e fornecidos na dieta para truta arco-íris (BAE et al., 2019). Foi utilizada uma dieta basal com 50% de farinha de peixe como controle. Quatro outras dietas substituíram 12,5%, 25%, 37,5% e 50% de farinha de

peixe por hidrolisado. Os animais foram alimentados com 3% a 4% do peso corporal duas vezes ao dia. Ao final de sete semanas de alimentação, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico, a eficiência alimentar e a taxa de eficiência proteica de peixes alimentados com dieta controle foram significativamente maiores do que em dietas que consumiram 50% de hidrolisado como substituição. Mas não houve diferenças entre o controle e as demais dietas. Além disso, não houve diferenças significativas nos níveis de lisozima, superóxido dismutase, glicose e proteína total em todas as dietas experimentais. Estes resultados indicaram que a faixa ótima de substituição de farinha de peixe por hidrolisado de atum é maior do que 29,7% e menor do que 37,5%.

Aksnes et al. (2006a) estudaram seis dietas diferentes para truta arco-íris contendo níveis e frações diferentes de hidrolisado proteico de pescado. Como grupos controles para comparação, foram formuladas uma dieta rica em fontes proteica de origem vegetal e uma dieta rica em farinha de peixe. Os melhores resultados de desempenho foram com os animais que consumiram a dieta contendo farinha de peixe e o pior resultado foi com a dieta que continha apenas proteínas de origem vegetal. Os autores concluíram que a remoção de compostos de baixo peso molecular do hidrolisado de peixe, reduz o crescimento e a eficiência alimentar. Eles ainda afirmam que alguns destes compostos podem ser essenciais para o desempenho biológico, já que o metabolismo proteico e energético dos animais pode estar sendo alterado.

A influência da alimentação de trutas arco-íris com hidrolisado foi avaliada no metabolismo da taurina e da anserina (AKSNES et al., 2006b). As dietas continham níveis e frações diferentes de hidrolisado proteico, em comparação com dietas controle contendo farinha de peixe e proteína de origem vegetal. O nível de inclusão e a fonte das proteínas não influenciaram nos resultados. Os autores sugeriram que a taurina e a anserina são reguladas de forma homeostática e não são afetadas pela alimentação.

Em outro experimento envolvendo o metabolismo dos aminoácidos, Aguirre et al. (1995) observaram que a excreção de nitrogênio da truta arco-íris alimentadas com uma dieta à base de hidrolisado de proteína de peixe foi maior do que em peixes alimentados com uma dieta à base de farinha de peixe. Isto foi atribuído a uma absorção e digestão mais rápida, e um conseqüente aumento do catabolismo dos aminoácidos em excesso presentes no plasma. Estes autores sugeriram que um aumento de hidrolisado de proteína de peixe nas dietas pode reduzir retenção de nitrogênio. Entretanto, o hidrolisado utilizado neste trabalho foi utilizado para substituir 100% da farinha de peixe, ocasionando em um nível alto de inclusão. A elevada inclusão de hidrolisado

pode ser prejudicial para salmonídeos (HEVROY et al., 2005; REFSTIE et al., 2004), como demonstrado no início deste capítulo.

Através dos presentes trabalhos demonstrados até aqui, percebe-se a carência sobre informações mais específicas sobre a utilização de hidrolisados proteicos em alimentação de trutas arco-íris. Além da importância mundial desta espécie, é preciso determinar como o tipo de enzima utilizada interfere nas propriedades funcionais do hidrolisado (SLIZYTÉ et al., 2009). Desta forma o objetivo geral será avaliar o efeito da enzima na produção e caracterização de hidrolisados proteicos de víscera industrial de sardinha e sua influência no desempenho, fisiologia e eficiência metabólica de trutas arco-íris.

3 CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO AUTOLÍTICO DE VÍSCERAS INDUSTRIAIS DE SARDINHA (*Sardinella* sp.)

RESUMO

O processo autolítico tem sido pouco estudado e explorado para a produção de subprodutos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo caracterizar a utilização de enzimas endógenas para a produção de hidrolisados de vísceras industriais de sardinha (*Sardinella* sp.). Vísceras oriundas de indústria pesqueira foram coletadas da linha de produção e imediatamente transportadas e congeladas à -25° C, até o momento do uso. O descongelamento foi em geladeira, mantida durante 12 horas. Foram realizadas testes em triplicata para a determinação dos efeitos do pH (2 a 10,5), tempo (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 24 e 36 horas) e temperatura (4, 23, 30, 36 42, 48, 54, 60 e 66° C) sobre a atividade de hidrólise. Decorrido o tempo de hidrólise, as enzimas foram inativadas à 90°C por 10 minutos. A fração solúvel foi coletada e utilizada para a determinação do grau de hidrólise (GH) pelo método ortoftaldialdeído (OPA). Foi verificada a normalidade e homocedasticidade e realizado a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Duncan (5%). Pode-se concluir que as enzimas endógenas são adequadas para a produção de hidrolisados de vísceras de sardinha, desde que em condições monitoradas e se conheça as condições da matéria-prima. Entre as características testadas para a produção de hidrolisado, os melhores resultados foram encontrados com uma incubação de 4 horas, utilizando pH 8,4 e a temperatura de 42 °C.

Palavras-chave: Enzimas endógenas; Hidrolisado proteico; Autólise; *Sardinella*

3.1 INTRODUÇÃO

A indústria de processamento de pescado produz uma grande quantidade de resíduos, que muitas vezes não possuem um adequado destino para seu descarte (STORI et al., 2002), tornando-se um problema para a cadeia de produção. A sardinha (*Sardinella* sp.) é capturada, geralmente, para uso na indústria de enlatamento (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011) e sua industrialização gera em média 47,8% de resíduos, para eviscerados ou espalmados (PESSATTI, 2001). Neste contexto, o hidrolisado proteico de pescado pode ser uma possibilidade econômica para estes descartes e resíduos (CHABEAUD et al., 2009).

A hidrólise enzimática utiliza enzimas proteolíticas em uma técnica que permite recuperar e até aumentar o valor nutricional e funcional das proteínas presentes na matéria-prima (BATISTA, et al., 2006). A possibilidade de seleção de enzimas proteolíticas auxilia no controle do grau de clivagem das proteínas do substrato (ONODENALORE; SHAHIDI, 1996). A temperatura, tempo de hidrólise e pH, também são parâmetros que determinam o resultado da hidrólise (LAHL; BRAUN, 1994).

Diversas enzimas proteolíticas podem ser usadas para hidrolisar as proteínas de peixes e gerar os hidrolisados, sendo algumas muito comuns, como a Protamex®, pepsina, alcalase, papaína, tripsina, α -quimotripsina, pancreatina, entre outras (CHALAMAIAH et al., 2012). A produção de hidrolisados de proteínas de peixe também pode ser realizada utilizando um processo autolítico, dependendo apenas da ação das enzimas digestivas do próprio peixe, sem custos com enzimas comerciais (SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). Enzimas endógenas já foram investigadas para a produção de hidrolisados de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003), bacalhau (*Gadus morhua*) (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005) atum-bala (*Auxis rochei*) (MAIZ et al., 2018) e tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SILVA et al., 2014). O hidrolisado produzido com enzimas endógenas de tilápia do Nilo possui características que permitem a sua utilização como ingrediente em dietas para peixes (SILVA et al., 2014).

As vísceras industriais de *Sardinella* sp. foram relatadas como ótima matéria-prima na produção de hidrolisados para aplicação na aquicultura (WOSNIAK et al., 2016). As enzimas digestivas extraídas de *Sardinella aurita*, são eficientes para produzir hidrolisados com atividade antioxidante (BARKIA et al., 2010) e o extrato enzimático bruto de sardinha (*Sardina pilchardus*) hidrolisando resíduos de *Sardinella aurita*, produziu hidrolisados bioativos com capacidades inibidoras da enzima conversora de

angiotensina (ECA) (BOUGATEF et al., 2008). Desta forma, as vísceras industriais de *Sardinella* e suas enzimas endógenas possuem potencial para desenvolvimento e exploração científica. O uso de enzimas endógenas de vísceras, sem prévia etapa de purificação da enzima, é um método direto e de baixo custo para a produção de hidrolisados proteicos (MAIZ et al., 2018). No entanto, há poucos trabalhos utilizando a autólise para a produção de hidrolisados de vísceras.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar o processo autolítico de vísceras industriais da sardinha (*Sardinella* sp) visando a produção de hidrolisados proteicos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e caracterização das vísceras de sardinha

As vísceras de sardinha já retiradas por sucção diretamente da linha de produção industrial, foram provenientes e gentilmente cedidas pela GDC Alimentos S.A., indústria de processamento de pescado localizada em Itajaí, Santa Catarina, Brasil. Todo material coletado na indústria foi armazenado em sacos plásticos assépticos com as respectivas identificações e transportados dentro de caixas isotérmicas contendo gelo até o Laboratório de Bioquímica e Bromatologia. Para a produção do hidrolisado utilizando as enzimas endógenas foi necessário que o resíduo industrial de vísceras de sardinha fosse coletado de forma rápida para deslocamento até o laboratório. O material coletado foi separado em alíquotas e congelado à -25° C.

A composição química do resíduo possuía aproximadamente 45,3% de umidade, 25,72% de proteína bruta, 62,16% de extrato etéreo e 4,27% de matéria mineral. As análises de composição dos resíduos foram realizadas de acordo com Horwitz (2000): proteína bruta (PB%, método de Kjeldhal), extrato etéreo (EE%, método de Soxhlet), cinzas (MM%, incineração em mufla à 550-600°C). O teor de Umidade foi determinado por radiação infravermelha.

3.2.2 Preparação das amostras

O descongelamento era realizado apenas no momento do uso, de forma gradual em geladeira até a temperatura entre 0 e 1°C. O material foi pré-triturado em processador de facas em estado semi-congelado por 30 segundos e triturado com Tissue Tearor em velocidade 4 por 30 segundos. Após este processamento, o material era imediatamente incubado para a realização dos respectivos testes.

3.2.3 Efeito do pH

Como o resíduo era composto de tratos digestivos íntegros de sardinhas havia probabilidade da hidrólise ter contribuições das enzimas endógenas ácidas provenientes principalmente do estomago. Também havia a possibilidade de grandes quantidades de enzimas alcalinas oriundas dos cecos pilóricos e intestinos dos animais. Foram produzidos tampões citrato-fosfato 0,5M com pHs entre 2 e 9 e carbonato-bicarbonato 0,5M entre pH 9,5 e pH 10,5. Na unidade de pH em que se encontrou a maior atividade, foi procedida a repetição do ensaio com intervalos de 0,2 unidades de pH.

Foram incubados 5ml de vísceras (previamente pesadas) com 3ml de tampão, em triplicata, e mantidos à 55°C por 90 minutos.

Após o tempo de reação de hidrólise a temperatura do homogeneizado foi elevada a 90°C por 10 minutos para a inativação das enzimas. Foram realizado alíquotas em triplicata, sem passar pelo processo de hidrolise, para ser considerado um valor inicial e também para produzir tubos controle dos testes (branco). Os homogeneizados foram filtrados em peneira comum (malha de 1 mm) com a finalidade de separar restos inorgânicos como espinhas e escamas da solução. Os tubos de ensaio foram centrifugados a 7200 RCF por 10 minutos. A fração solúvel foi utilizada para a realização da determinação do grau de hidrolise (GH).

Após averiguação dos resultados, foi constatado que o melhor pH testado nas alíquotas estava no intervalo de pH entre 8 e 9. Para melhorar a precisão, utilizou-se a mesma metodologia já citada. Porém foi realizado os testes em pH 8,2; 8,4; 8,6 e 8,8.

3.2.4 Efeito da temperatura

Para os testes de temperatura, as alíquotas foram homogeneizadas em tampão citrato-fosfato 0,5M pH 8,4 e incubadas por 90 minutos em nove temperaturas diferentes: 4, 23, 30, 36 42, 48, 54, 60 e 66 °C. Assim como mencionado na metodologia anterior, também foi realizado uma alíquota inicial e tubos controle (zero). Os demais procedimentos (inativação das enzimas, centrifugação) seguiram o protocolo descrito para os testes de pH.

3.2.5 Efeito do tempo

A determinação do efeito do tempo de hidrólise utilizou alíquotas de 5ml de vísceras (previamente pesadas) com 3ml de tampão citrato-fosfato 0,5M pH 8,4 foram

incubadas à 55° C por 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 24 e 36 horas de incubação. Os demais procedimentos (inativação das enzimas, centrifugação) seguiram o protocolo descrito para os testes de pH.

3.2.6 Grau de hidrólise

A determinação do grau de hidrólise (GH) foi uma adaptação do método de Nielsen et al. (2001), explorando-se a reatividade do “o-phthaldialdehyde” (OPA) com amino-grupos. As análises foram realizadas em microplacas de fundo transparente, pela adição de 40 µl de amostra e 260 µl do reagente OPA. As leituras de absorbância foram realizadas em 340 nm em leitora de microplacas modelo Genius, marca Tecan, e o resultado expresso como GH (%), através da equação:

$$\text{GH (\%)} = [(\text{Serina-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv} / \text{g proteína}] / \text{htot} * 100$$

Os valores de α , β e htot utilizados foram os determinados previamente por Adler-Nissen (1986) para pescado: 1,00; 0,40 e 8,6, respectivamente.

3.2.7 Análise estatística

Foi verificada a normalidade e homocedasticidade e posteriormente foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Duncan (5%) através do programa estatístico SAS versão 9.0.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeito do pH

A alcalinidade do meio influenciou na hidrólise. Primeiramente foi observado maiores valores de GH na faixa de pH entre 8 e 9 (Figura 1). O segundo ensaio confirmou que as enzimas endógenas predominantes são alcalases com intervalo de pH entre 8,4 e 8,6 (Figura 2). O pH 8,4 foi considerado o mais eficiente entre os valores testados.

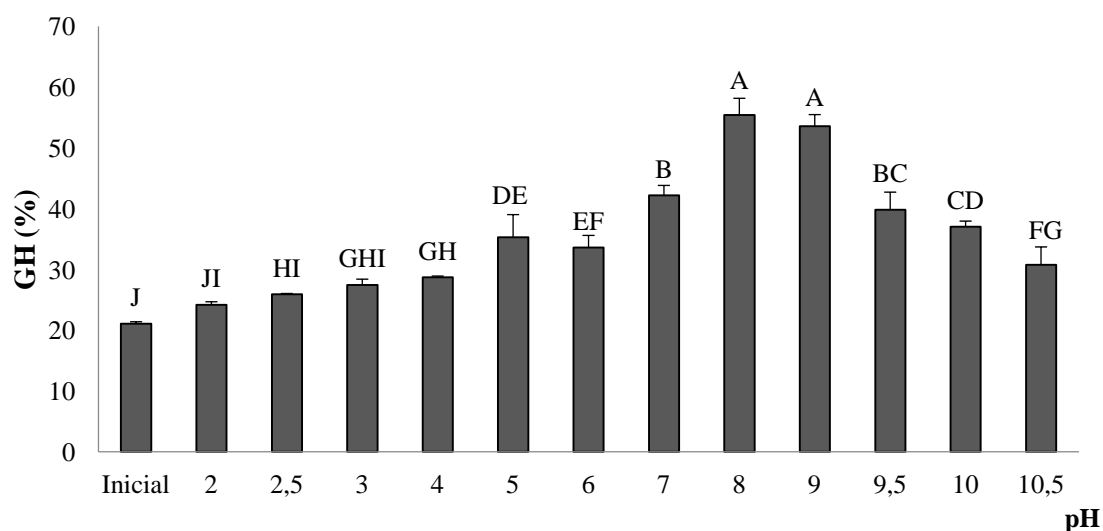


Figura 1 Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em diferentes pHs. Os valores plotados representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes denotam diferença entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). GH = Grau de hidrólise.

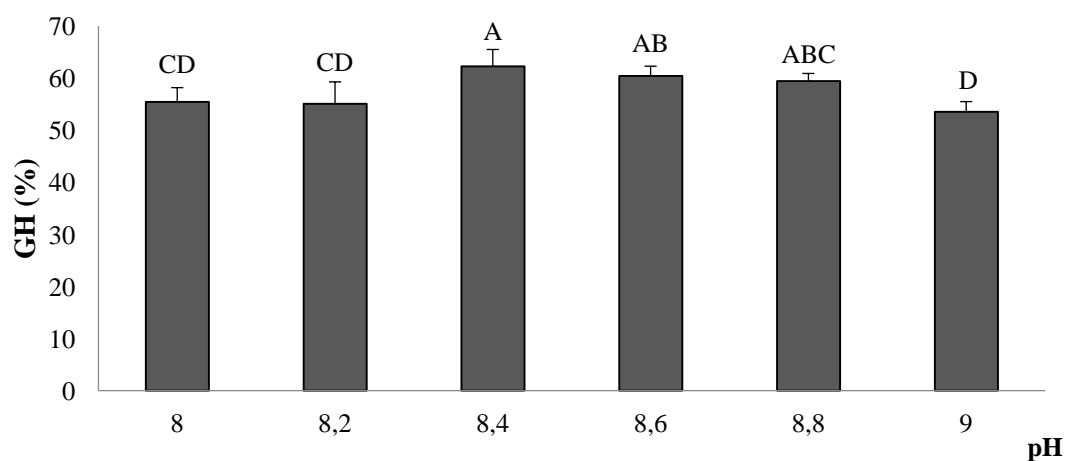


Figura 2 Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em pHs alcalinos. Os valores plotados representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes denotam diferença entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). GH = Grau de hidrólise.

3.3.2 Efeito da temperatura

O maior valor de GH encontrado foi com a temperatura de 42° C (Figura 3). Entretanto, não foi observado diferença no GH de hidrolisados produzidos à 42, 48, 54 e 60° C. Temperaturas até 36° C e de 66° C resultaram em menor eficiência da hidrólise.

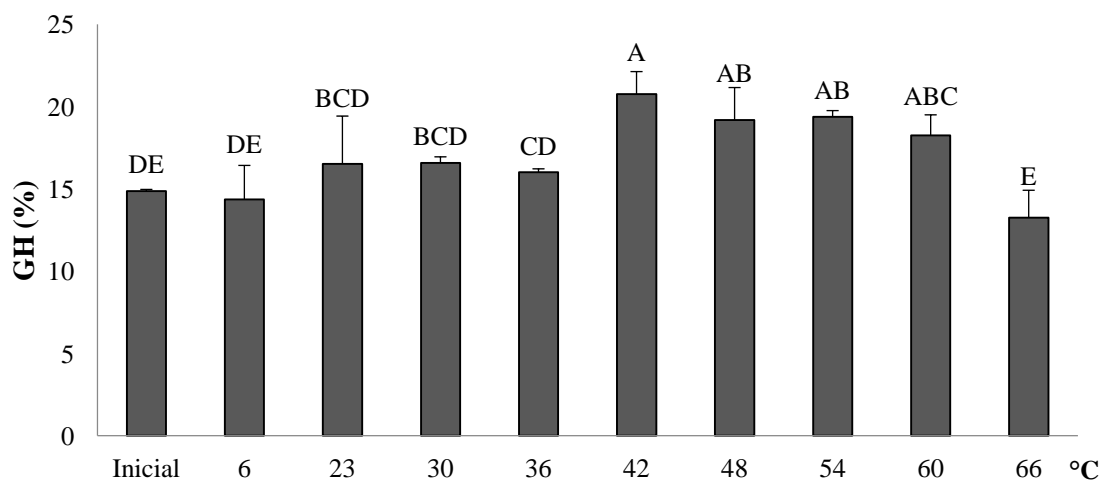


Figura 3 Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em diferentes temperaturas. Os valores plotados representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes denotam diferença entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). GH = Grau de hidrólise.

3.3.3 Efeito do tempo

O GH aumentou com o passar do tempo (Figura 4). O valor máximo de hidrólise foi encontrado em 36 horas. Porém, a partir de quatro horas de hidrólise não foi encontrado diferença ($P > 0,5$) entre os tempos.

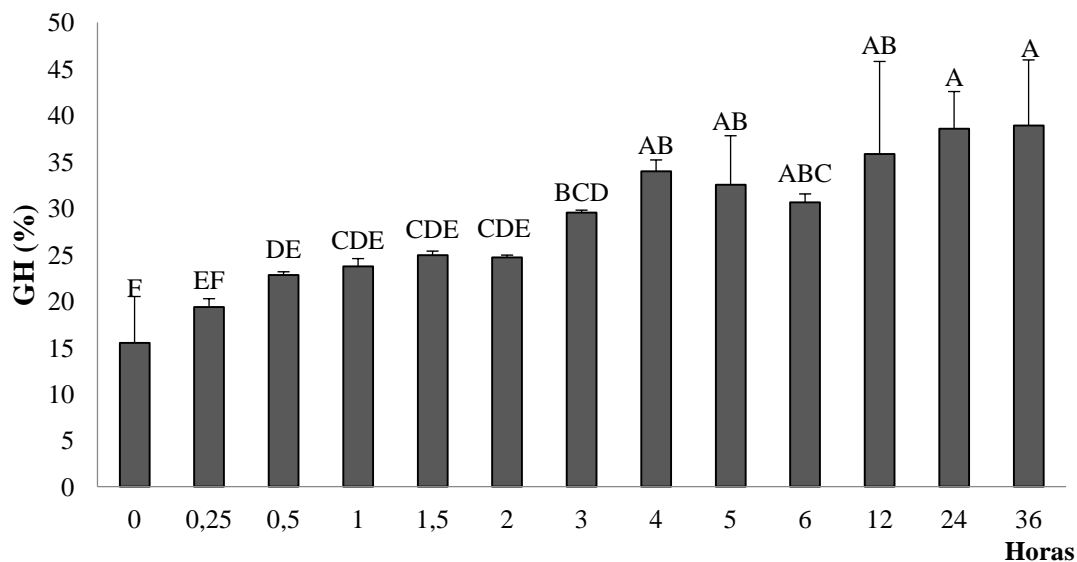


Figura 4 Avaliação da hidrólise endógena de vísceras de sardinha em diferentes tempos. Os valores plotados representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes denotam diferença entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). GH = Grau de hidrólise.

3.4 DISCUSSÃO

As enzimas endógenas do trato digestivo da sardinha foram eficientes para produzir hidrolisados de médio GH. Os valores de GHs encontrados são semelhantes à de hidrolisados de resíduo de sardinha utilizados na alimentação de peixes (WOSNIAK et al., 2016; HA et al., 2019). A hidrólise melhorou com a alcalinização do meio, provavelmente devido as enzimas oriundas do lúmen intestinal. O resíduo industrial era constituído pelo trato digestório completo dos animais. A sardinha é um onívoro de pequeno porte (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011) com o sistema digestório composto principalmente pelo esôfago, estômago, intestino, cecos pilóricos e fígado (SMICHI et al., 2010). A maior parte da digestão destes peixes ocorre no intestino (STECH; CARNEIRO; PIZAURO-JÚNIOR, 2009) com a utilização de proteases alcalinas (BAKKE; GLOVER; KROGDAHL, 2010). O trato digestivo de peixes geralmente possui alta concentração de tripsina e quimotripsina (KLOMKLAO et al., 2007). As enzimas possuem particularidades para a realização de quebra das ligações peptídicas (SUN et al., 2016), apresentando certo grau de especificidade pelo substrato (NELSON; COX, 2014). As enzimas alcalinas tiveram uma maior amplitude de atuação do que as enzimas ácidas. Isto pode estar relacionado às aptidões de cada tipo de enzima. As proteases gástricas geralmente estão relacionadas a uma degradação inicial, enquanto as quebras menores ocorrem no intestino (BALDISSEROTTO, 2013). A produção de hidrolisados com enzimas endogenas de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SILVA et al., 2014), também foram eficientes em pHs alcalinos. As enzimas intestinais costumam ser ativas e estáveis em um intervalo de pH de 7,5 a 10,0 (DE VECCHI E COPPES, 1996; SIMPSON, 2000). Esta característica foi observada no presente estudo, em que pHs inferiores a 8 e superiores a 9 diminuíram a eficiência enzimática. O pH entre 8,0 e 9,0 tem sido relatado para atividades de proteases alcalinas de algumas espécies de sardinha, como a sardinha de Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) (CASTILLO-YANEZ et al., 2005), sardinhas europeias (*Sardina pilchardus*) (BOUGATEF et al., 2007) e sardinela-lombuda (*Sardinella aurita*) (KHALED et al., 2011).

Assim como aconteceu com o pH, as enzimas necessitam de um intervalo ótimo de temperatura para melhor eficiência. No presente estudo, o melhor intervalo testado foi de 42-60° C. Estes resultados coincidem com o intervalo ideal de atividades de enzimas alcalinas de variadas espécies de sardinha, tais como *Sardinops melanostictus* (60° C) (KISHIMURA et al., 2006), *Sardina pilchardus* (60° C) (BOUGATEF et al.,

2007) e *Sardinella aurita* (50-55° C) (KHALED et al., 2011). Estas temperaturas ótimas de eficiência das proteases alcalinas da sardinha são superiores as temperaturas de seu habitat natural. Isto demonstra que a temperatura do habitat dos animais não está relacionada com a termoresistência ou temperatura ótima de ativação das proteases. O intervalo de temperatura ideal das proteases alcalinas encontradas no presente estudo coincide com a de bacalhau (*Gadus macrocephalus*), um peixe de água fria (40-45° C) (FUCHISE et al., 2009). Também é semelhante a do peixe tropical tambaqui (*Colossoma macropomum*) (60 e 55° C) (BEZERRA et al., 2001). Não existem explicações concretas conhecidas que possam elucidar este fenômeno. As necessidades de adaptações e seleção natural dos organismos aquáticos, devido às mudanças climáticas que ocorreram durante sua evolução, pode ser uma possível explicação (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012). As enzimas eram estáveis em temperaturas abaixo de 40°C e foram perdendo a eficiência em temperaturas superiores a 60°C. Esta características também se assemelham a *Sardina pilchardus* (BOUGATEF et al., 2007) e *Sardinella aurita* (KHALED et al., 2011). Os testes de temperaturas para produzir hidrolisados com enzimas endógenas de raia-lenga (*Raja clavata*) também resultou em uma melhor eficiência com temperaturas próximas ao intervalo demonstrado nesse estudo (em torno de 49°C) (PASTORIZA et al., 2003). As proteases alcalinas demonstram ser termoestáveis, podendo ser interessante seu uso industrial. Percebe-se que as proteases alcalinas de organismos aquáticos são ativas em condições adversas (KLOMKLAO et al., 2005).

O GH aumentou com o passar do tempo, até 4 horas. Ocorreu uma fase inicial rápida, seguida por uma diminuição na taxa de hidrólise com uma tendência para o estado estacionário. Este é um comportamento que já foi demonstrado para diversos substratos (HOYLE e MERRIT, 1994), como na utilização de enzimas comerciais para hidrolisar salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (KRISTINSSON e RASCO, 2000), atum albacora (*Thunnus albacares*) (NGUYEN et al., 2011), beijupirá (*Rachycentron canadum*) (FONSECA et al., 2016), corvina (*Micropogonias furnieri*) (AMORIM; DESCHAMPS e PESSATTI, 2016) e em autolisados de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003), bacalhau (*Gadus morhua*) (ASPMO; HORN e EIJSINK, 2005) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SILVA et al., 2014). Em relação aos tempos testados neste estudo pode-se perceber que a hidrólise acima de 4 horas pode não ser necessária, tendo em vista que não aumentou significativamente o GH. No entanto, é possível que o perfil de peptídeos em tempos maiores de hidrólise sejam

diferentes, o que não foi determinado neste trabalho. Esses tempos maiores de hidrólise apenas se justificariam se forem encontradas diferenças no perfil e atividades biológicas específicas (AMORIM; DESCHAMPS e PESSATTI, 2016).

Todos os ensaios de atividade neste estudo foram realizados em condições cuidadosamente monitoradas, visando gerar repetibilidade. Entretanto as diferenças entre lotes de matéria-prima podem influenciar diretamente nestes dados. Como observado, os dados de GH da matéria-prima antes do processamento já demonstram uma certa porcentagem de hidrólise e que variam, mesmo dentro de um mesmo estudo (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016). Mesmo em temperaturas baixas foi observado que as enzimas endógenas podem atuar. Esta característica se torna ainda mais relevante para um resíduo industrial. Durante a evisceração e sucção das vísceras, ocorrem rompimento de tecidos que com a temperatura ambiente desencadeiam o processo de hidrólise. Estas características são as responsáveis pela variação de GHs de hidrolisados de vísceras de sardinha produzidas por hidrólise endógena, bem como também contribuem para a variabilidade de GHs de estudos com enzimas comerciais.

3.5 CONCLUSÃO

As enzimas endógenas podem ser utilizadas na produção de hidrolisados de vísceras de sardinha, desde que em condições monitoradas. Podem ocorrer diferenças importantes entre lotes de matéria-prima, podendo gerar alterações na repetibilidade dos resultados.

Entre as características testadas neste estudo, os melhores parâmetros para a produção de hidrolisado com as enzimas endógenas de sardinha que economizam tempo, reagente e trabalho são: pH 8,4, temperatura de 42 °C e tempo de 4 horas.

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzyme hydrolysis of food proteins**. England: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427p.

AMORIM, R. G. O.; DESCHAMPS, F. C.; PESSATTI, M. L. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 967-974, 2016.

AOAC. **Official methods of analysis**. (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2000.

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1957-1966, 2005.

BAKKE, A. M.; GLOVER, C.; KROGDAHL, A. **Feeding, digestion and absorption of nutrients**. **Fish Physiology**. [S.l: s.n.], v. 30, p. 57-110, 2010.

BARKIA, A.; BOUGATEF, A.; KHALED, H. B.; NASRI, M. Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 303-320, 2010.

BALDISSEROTO, B; RADUNZ NETO, J. **Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura**. 3.ed. USFM, 2013.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NUNES, M. L. **Hidrolisados Proteicos de Pescado: preparação, propriedades e utilização**, v.14, Publicações Avulsas: IPIMAR, 2006.

BEZERRA, S. R.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A ; CARVALHO JR, L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 199-210, 2001.

BOUGATEF, A.; SOUISSI, N.; FAKHFAKH, N.; ELLOUZ-TRIKI, Y.; NASRI, M. Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 102, Issue 1, p.343-350, 2007.

BOUGATEF A.; NEDJAR-ARROUME, N.; ROZENN RAVALLEC-PLE B , YVES Leroy C, GUILLOCHON, D.; BARKIA A.NASRIA M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein

hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food Chemistry**, v. 111, p. 350–356, 2008.

CASTILLO-YÁÑEZ, F. J.; PACHECO-AGUILAR, R.; GARCIA-CARRENÓ, F. L.; NAVARRETE-DEL TORO, M. L. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comparative Biochemistry and Physiology (part B)**, v.140, n.1 p. 91-98, 2005.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. **Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Sardinha-verdadeira do Brasil**. [S.l: s.n.], 2011.

CHABEAUD, A.; VANDAJON, L.; BOURSEAU, P.; JAOUEN, P.; GUÉRARD, F. Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 408–414, 2009.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3020–3038, 2012.

DE VECCHI, Z; COPPES, S. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic region – A review. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p. 193-214, 1996.

FONSECA, R. A. S., SILVA, C. M., FERNANDES, G. R. ; PRENTICE, C. Enzymatic hydrolysis of cobia (*Rachycentron canadum*) meat and wastes using different microbial enzymes. **International Food Research Journal**, v. 23, n.1, p.152-160, 2016.

FUCHISE, T.; KISHIMURA, H.; SEKIZAKI, H.; NONAMI, Y. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). **Food Chemistry**, v.116, p.611-616, 2009.

FREITAS-JÚNIOR, A. C. V.; COSTA, H. M. S.; ICIMOTO, M. Y.; HIRATA, I. Y.; MARCONDES, M.; OLIVEIRA, V.; BEZERRA, R. S. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food Chemistry**, v. 133, Issue 4, p.1596-1602, 2012.

HA, N; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S; SUGAI, J. K. PESSATTI, M. L; MOURINO, J. L.; FABREGA, T. E. H. P. Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture**, v. 500, n.1, p. 99-106, 2019.

HALVER, J. E.; HARDY, R. W. **Fish Nutrition**. In: Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, G., Eds., *The Lipids*, 3rd, Edition, Academic Press, California, p.182-246, 2002.

HOYLE, N.T.; MERRITT, J. H. Qualidade do hidrolisado de proteína de peixe de arenque (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v.59 ,p.76 -79, 1994.

KHALED, H. B.; JELLOULI, K .; SOUISSI, N .; GHORBEL, S .; BARKIA, A. ; NASRI, M.. Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, Issue 1, p.123-133, 2011.

KISHIMURA, H.; HAYASHI, K. ; MIYASHITA, Y.; NONAMI, Y.Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric caeca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). **Food Chemistry**, v. 97, p.65-70. 2006.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. ; SIMPSON, B. K. Trypsin from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). **Comparative Biochemistry and Physiology** (part B), v.148, p.382-289, 2007.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W;. KISHIMURA, H.; SIMPSON, B. K. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.40, p.3061-3067, 2005.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technol.**, Chicago, v.48, n.10, p.68-71, 1994.

MAIZ H.; GUADIX, E; GUADIX, A; GARGOURI, M, ESPEJO-CARPIO, F. Valorisation of tuna viscera by endogenous enzymatic treatment. **International Journal of Food & Science Technology**, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NGUYEN, H. T. M.; SYLLA, K. S. B.; RANDRIAMAHATODY, Z.; DONNAY-MORENO, C.; MOREAU, J.; TRAN, L. T.; BERGÉ, J. P. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. **Food Technol. Biotechnol**, v. 49, n. 1, p. 48-55, 2011.

NILSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 66, p. 642-646, 2001.

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 5, 1996.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA JR, J.; BERNÁRDEZ, M. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 83-88, 2003.

PESSATTI, M. L. **Aproveitamento dos sub-produtos do pescado**. Itajaí: MAPA/UNIVALI, 2001. 130p.

SHAHIDI, F.; H., X., Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.

SILVA; J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96-106, 2014.

SIMPSON B. K. Digestive proteinases from marine animals. **Food science and technology**-New york-marcel dekker, p.191-214, 2000.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO-JÚNIOR, J. M. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. **Ensaio e Ciência: ciências biológicas, agrárias e da saúde**, v. XIII, n. 2, p. 79- 93, 2009.

STORI, F. T.; BONILHA, L. E. C.; PESSATTI, M. L. Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos. In: Instituto Ethos de Empresas e Responsabilidade Social. **Jornal Valor Econômico**. Responsabilidade social das empresas. São Paulo, p. 373-406, 2002.

WOSNIAK, B.; MELIM, E. W. H.; HA, N.; UCZAY, J.; PILATTI, C.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, p. 957-966, 2016.

4 CAPÍTULO 3 – DIFERENTES PROTEASES INFLUENCIAM NA CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERAS INDUSTRIAIS DE SARDINHA (*Sardinella* sp.)

RESUMO

A protease utilizada na elaboração do hidrolisado proteico, juntamente com a natureza da matéria-prima, determinam as características do processo e dos produtos gerados. Foram investigados os efeitos de três tratamentos diferentes na produção de hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha: Protamex®, Pepsina suína e Enzimas Endógenas. Vísceras oriundas de indústrias pesqueiras foram imediatamente coletadas, transportadas e utilizadas para a produção dos hidrolisados. Após processamento, hidrólise e incubação com a enzima correspondente, as enzimas eram inativadas. Os hidrolisados foram descritos e caracterizados quanto ao grau de hidrólise, faixa de peso molecular dos peptídeos, composição química, perfil de aminoácidos e desenvolvimento microbiológico de bactérias lácticas. Os níveis proteicos dos hidrolisados chegaram ao valor máximo de 36,65% e valor mínimo de 31,02%. O hidrolisado produzido com pepsina resultou em um hidrolisado com a maior quantidade de lipídeo, enquanto o menor valor foi observado no hidrolisado produzido com enzimas endógenas. O GH do hidrolisado Protamex foi observado com o maior valor (19,9%). Não ocorreram grandes diferenças entre os perfis dos aminoácidos dos hidrolisados. Ocorreram diferenças entre os tamanhos de peptídeos nas diferentes frações. O hidrolisado produzido com enzimas endógenas possui maiores quantidades de aminoácidos livres, sendo a maior parte constituída por aminoácidos hidrofóbicos. Também possui maiores quantidades de pequenos peptídeos. Entretanto, a quantidade de peptídeos de 20 kDa a 5kDa foi inferior aos demais hidrolisados, enquanto esse foi o maior produto de quebra do hidrolisado Pepsina. Os tamanhos de peptídeos que mais se destacaram no hidrolisado produzido com Protamex® foi de 2 a 5 kDa. Todos os hidrolisados proteicos inibiram o crescimento das bactérias *Lactococcus* em comparação com o controle positivo MRS. Contudo ao ser realizada a comparação entre os diferentes hidrolisados, foi constatada diferença nos níveis de inibição. O hidrolisado produzido com enzimas endógenas inibiu o crescimento das bactérias lácticas em níveis superiores ao hidrolisado produzido com Protamex®. A caracterização dos hidrolisados foi influenciada pelo tipo da enzima utilizada. A quantidade de nutrientes e o perfil de aminoácidos dos hidrolisados indicam que eles podem ser utilizados na aquicultura. Todavia, o efeito das características nutricionais destes hidrolisados necessitam de uma investigação mais minuciosa.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Hidrolisado proteico; Autólise; Protamex; Pepsina; *Sardinella*

4.1 INTRODUÇÃO

O hidrolisado proteico de pescado é uma alternativa para a incorporação de proteínas em outras fontes de alimento para o consumo animal (MARTÍNEZ-ALVAREZ; CHAMORRO; BRENES, 2015). A escolha da protease hidrolítica depende do custo da enzima e do resultado final desejado após a hidrólise (BENJAKUL et al., 2014). As enzimas têm diferentes especificidades para clivar as ligações peptídicas, sendo influenciada pela matéria-prima (SUN et al., 2016). Estas especificidades alteram o perfil de peptídeos e aminoácidos, interferindo na qualidade e eficiência do hidrolisado obtido (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A Protamex® (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) é uma mistura de proteases microbianas, produzida com enzimas de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (KOUAKOU et al., 2014; LIASET et al., 2002). Trata-se de uma enzima amplamente utilizada para a produção de hidrolisado de diversas espécies, tais como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (LIASET; JULSHAMN; ESPE, 2003); sardinha europeia (*Sardina pilchardus*) (DUMAY et al., 2009); atum-amarelo (*Thunnus albacares*) (NGUYEN et al., 2011); cavala do Atlântico (*Scomber scombrus*) (ENNAAS et al., 2015); corvina (*Micropogonias furnieri*) (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016); sardinha (*Sardinella sp.*) (WOSNIAK et al., 2016); entre outros.

Diversas outras enzimas proteolíticas podem ser usadas para hidrolisar as proteínas de peixe e gerar os hidrolisados (SAMARANAYAKA; LI-CHAN 2011). A pepsina, protease de origem animal, foi uma das primeiras proteases utilizadas em pesquisas envolvendo hidrolisados (NAKAJIMA et al., 2009; NAZEER et al., 2011; RAJARAM; NAZEER, 2010; VIEIRA et al., 1995; VON DER DECKEN et al., 1992). Também é possível a produção de hidrolisados proteicos de pescado utilizando as próprias enzimas endógenas dos animais, sem custos com enzimas comerciais através de uma operação simplificada (MAIZ et al., 2018; SHAHIDI; HAN; SYNOWIECKI, 1995). As enzimas endógenas envolvidas no processo de hidrólise autolítica correspondem a uma mistura de diversas proteases do trato gastrointestinal, as quais possuem variados requisitos de atividade, resultando em produtos finais de diferentes perfis moleculares (KRISTINSSON e RASCO, 2000) dependente das condições de hidrólise (como tempo e temperatura) (PASTORIZA et al., 2003; SILVA et al., 2014).

A avaliação das características e funcionalidades do hidrolisado podem ser demonstradas por parâmetros como grau de hidrólise (GH) e distribuição de peso

molecular dos peptídeos (TOSSAVAINEN et al., 1997; CHALAMAIAH et al., 2012). Estes parâmetros são utilizados para comparar os diferentes tipos de hidrolisados proteicos (MAHMOUD et al., 1994; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). O meio mais prático de controlar o processo de hidrólise é a determinação do GH, que pode ser expresso como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994; HE et al., 2013). O peso molecular dos hidrolisados proteicos é um dos fatores mais importantes na produção de hidrolisados com propriedades funcionais (NEVES, 2001; ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). A caracterização química e o perfil de aminoácidos pode demonstrar potencialidade como um ingrediente a ser incorporado em rações ou alimentos processados (FURLAN e OETTERER, 2002; DUAN et al., 2010).

Os hidrolisados já foram demonstrados como uma ótima fonte de nitrogênio para crescimento de bactérias (DUFOSSEE et al. 2001). O crescimento de bactérias lácticas utilizando o hidrolisado de pescado em substituição aos meios de culturas comerciais já foi comprovado (SAFARI et al., 2012). A possível influencia como prebiótico no trato digestivo de peixes também já foi sugerida (HA et al., 2019).

O presente experimento descreve a utilização de três tratamentos diferentes para produzir hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha com interesse na aplicação aquícola. Neste estudo, os hidrolisados produzidos foram descritos e caracterizados quanto ao grau de hidrólise, faixa de peso molecular dos peptídeos, composição química, perfil de aminoácidos e desenvolvimento microbiológico de bactérias lácticas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Elaboração dos hidrolisados proteicos

Os hidrolisados foram produzidos no Laboratório de Bioquímica e Bromatologia da Universidade do Vale do Itajaí. Os resíduos de pescados utilizados como matéria-prima consistiam em vísceras frescas de sardinha (*Sardinella* sp.). Os subprodutos foram provenientes da GDC Alimentos S.A, localizada em Itajaí, Santa Catarina, Brasil, e da Camil Alimentos S.A, localizada em Navegantes, Santa Catarina, Brasil.

Foram produzidos três tipos de hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha. O que diferenciou os hidrolisados foi o tipo de enzima utilizada para a produção individual de cada produto. As enzimas utilizadas foram: Protamex® (Novozymes, Bagsvaerd,

Dinamarca), Pepsina suína (Bela Vista Produtos Enzimáticos, Alto Bela Vista, Santa Catarina, Brasil) e as Enzimas Endógenas do trato digestivo das sardinhas.

As vísceras de sardinha eram retiradas por sucção diretamente da linha de produção industrial. Este material coletado na indústria foi armazenado em sacos plásticos assépticos com as respectivas identificações e transportado dentro de caixas isotérmicas contendo gelo até o Laboratório de Bioquímica e Bromatologia. Imediatamente após a chegada, o material era processado de acordo com a metodologia de produção de cada hidrolisado.

Para a produção do hidrolisado com a enzima Protamex®, o resíduo de pescado foi homogeneizado com água destilada na proporção de 1:1. A enzima Protamex® foi acrescentada (1:500 E/P-Enzima/Pescado) com auxílio de um agitador e sistema de incubação à 55°C por 90 minutos. Estas metodologias foram adaptadas de Wosniak et al. (2016).

O hidrolisado produzido a partir de pepsina suína seguiu metodologia semelhante, entretanto as vísceras de pescado foram homogeneizadas em tampão ácido clorídrico - cloreto de potássio (0,1M, pH 2,0) na proporção 1:1. A enzima pepsina suína foi acrescentada (1:500 E/P-Enzima/Pescado) com auxílio de um agitador e sistema de incubação à 37°C por 210 minutos. Esta metodologia foi adaptada de Pastoriza et al. (2003) com modificações. Os autores citados realizaram a redução de pH de hidrolise, até o valor 2,5, com a aplicação de ácido clorídrico puro 1N e/ou 0,1N. Neste estudo foi utilizado tampão ácido clorídrico - cloreto de potássio para acidificar o pH de hidrolise. O tempo de hidrolise também foi modificado, sendo ampliado de 120 minutos para 210 minutos.

A produção de hidrolisado com enzimas endógenas do próprio trato digestório das sardinhas (autólise) também utilizou metodologia semelhante. Foi necessária a realização de uma caracterização enzimática prévia, para a determinação da condição ótima (de pH, temperatura e tempo) de hidrólise, conforme Gonçalves et al. (2019 – capítulo 2) com modificações. As vísceras foram homogeneizadas em tampão citrato-fosfato (0,15M, pH 8,4) na proporção 1:1 com auxílio de um agitador e sistema de incubação à 42°C por 240 minutos. A metodologia original utilizou tampão com 0,5M. Para o presente estudo a molaridade do tampão foi reduzida a fim de evitar quantidades exageradas de sal como resíduo do ingrediente.

Após o tempo de reação de hidrólise dos três tipos de hidrolisado, a temperatura do homogeneizado foi elevada a 85°C por 15 minutos para a inativação das enzimas. Os

homogeneizados foram filtrados em peneira comum (malha de 1 mm) com a finalidade de separar restos inorgânicos como espinhas e escamas da solução. Os filtrados obtidos foram colocados para secar em estufa de ventilação forçada à 60°C para obtenção da matéria seca e balanço de massa.

4.2.2 Caracterização química e grau de hidrólise

As análises de composição dos hidrolisados foram realizadas de acordo com Horwitz (2000). Consistem em: matéria seca (MS%, determinado por radiação infravermelha), proteína bruta (PB%, método de Kjeldhal), extrato etéreo (EE%, método de Soxhlet), cinzas (MM%, incineração em mufla à 550-600°C), extrativo não nitrogenado (%ENN, calculado) e energia bruta (EB kcal/kg, calculado).

Foi realizada a determinação do grau de hidrólise (GH). A metodologia utilizada foi adaptada do método de Nielsen et al. (2001), explorando-se a reatividade do “o-phthaldialdehyde” (OPA) com amino-grupos. As análises foram realizadas em leitor de microplacas modelo Genius, marca Tecan, em absorvância de 340 nm. O resultado foi expresso como GH(%), através da equação:

$$\text{GH (\%)} = [(\text{Serina-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv} / \text{g proteína}] / \text{htot} * 100$$

Os valores de α , β e htot utilizados são os determinados previamente por Adler-Nissen (1986) para pescado: 1,00; 0,40 e 8,6, respectivamente.

4.2.3 Composição de aminoácidos e aminoácidos livres

A análise de aminoácidos foi realizada após hidrólise ácida das amostras com HCl a 6N, durante 22 horas, a 110° C, em ampolas de vidro seladas a vácuo. As ampolas foram abertas e mantidas em dessecador contendo pastilhas de NaOH, para remover o HCl. As amostras foram ressuspensas em tampão citrato e filtradas em membrana Millipore de 0,22 μm , seguida de corrida cromatográfica em HPLC com derivatização pré-columa. As composições de aminoácidos e aminoácidos livres foram realizadas seguindo a metodologia de Hagen; Frost; Augustin (1989) e White; Hart; Fry (1986), e a determinação de triptofano de acordo com Lucas; Soutelo (1980).

4.2.4 Distribuição de peso molecular dos peptídeos

A determinação e distribuição de peso molecular dos peptídeos presentes nos hidrolisados foram realizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida em

condições desnaturantes (Tricina-SDS-PAGE 16% resolving gel, spacer gel 10%, stacking gel 4%), conforme Schagger (2006). As proteinas foram testadas em corrida eletroforética de aproximadamente 40 minutos em mini-gis, visando o estabelecimento das condies ideais de corrida. Foram realizadas corridas em géis com aproximadamente 5 horas de duração, 130V (voltagem constante) e cerca de 30mA inicial (por gel)  temperatura de 4C. Foi utilizado tampão de corrida Tris-Tricina (100mmol/L de Trizma e 100mmol/L de tricina), pH 8,25, em SDS 0,1%. O DTT foi incluído apenas no momento do uso. Foi utilizado como padrão uma mistura de proteinas de baixo peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA). As proteinas foram fixadas no gel e reveladas com azul de Coomassie ou com nitrato de prata (LAEMMLI, 1970; OAKLEY et al., 1980).

4.2.5 Avaliao microbiológica

Inicialmente foi inoculada uma cultura contendo bactéria do gnero *Lactococcus* extraída do trato digestivo de trutas arco-íris saudáveis. Essas bactérias foram então inoculadas novamente em tubos de ensaio de quatro tratamentos diferentes. Os tratamentos eram controle (meio MRS - Man Rogosa Sharpe), hidrolisado produzido com enzima Protamex, hidrolisado produzido com pepsina suína e hidrolisado produzido com enzimas endógenas. Os tratamentos consistiam em meios de cultura com as quantidades de nutrientes equilibradas, de forma que o hidrolisado era diluído em água e misturado meio MRS. Os tubos de ensaio contendo bactérias inoculadas foram encubados a 37C pão 24 horas.

Após período de incubao as amostras dos tubos de ensaio foram diluídos serialmente (1:10) em SSE. Em seguida foram semeados em placas de Petri com o meio de cultura MRS, para a contagem de colnias de bactérias. As placas de Petri foram incubados em temperatura de 37C por aproximadamente 48 horas e foram efetuadas as contagens totais de unidades formadoras de colnias (UFC).

Os resultados obtidos foram tabelados e realizou-se a verificao da normalidade e homocedasticidade dos dados. Posteriormente foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) através do programa estatístico SAS versão 9.0.

4.3 RESULTADOS

As três enzimas estudadas foram eficazes para a realização da hidrólise. O hidrolisado se dividia em quatro fases após a centrifugação por 7200 RCF por 10 minutos. As fases eram constituídas de óleo, fração solúvel, emulsão e fração insolúvel do hidrolisado final. As análises de composição química, grau de hidrólise, composição de aminoácidos e microbiológica foram realizadas com o hidrolisado bruto. As análises de perfil de peptídeos foram realizadas com as fases separadas.

4.3.1 Caracterização química e grau de hidrólise

A caracterização química dos hidrolisados esta descrita na tabela 1. Ocorreram pequenas variações entre os hidrolisados. As variações de PB ficaram entre 36,65% e 31,02%, o EE variou entre 52,30% e 45,29%, e o GH resultou em um máximo de 19,9% e um mínimo de 9,9%.

Tabela 1 – Composição bromatológica e grau de hidrólise dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.

Amostra	MS%	PB%	EE%	MM%	%ENN	EB (kcal/kg)	GH%
Protamex	63,48	36,65	48,69	10,57	4,09	6.559,5	19,9
Pepsina	52,85	31,02	52,30	9,21	7,47	6.708,7	17,6
Endogena	67,97	34,80	45,29	10,01	9,90	6.390,8	9,9

MS% matéria seca; PB% proteína bruta; EE% extrato etéreo; MM% cinzas; %ENN extrativo não nitrogenado; EB energia bruta; GH grau de hidrólise.

4.3.2 Composição de aminoácidos e aminoácidos livres

As composições dos aminoácidos dos hidrolisados estão apresentados na tabela 2. A composição entre os aminoácidos foi semelhante. Os aminoácidos livres estão apresentados na tabela 3. O hidrolisado produzido com enzimas endógenas possui maiores quantidades de aminoácidos livres (16,66%) em comparação com os demais. Os aminoácidos livres que estiveram em maiores quantidades no hidrolisado produzido com enzimas endógenas foram os de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina), a glicina, lisina, alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico. O hidrolisado produzido com enzima Protamex® e o com pepsina obtiveram quantidades de aminoácidos livres semelhantes. A arginina foi mais evidente no hidrolisado produzido com Protamex®.

Tabela 2 – Composição de aminoácidos dos hidrolisados (% de material seco).

Aminoácidos (%)	Hidrolisado Protamex®	Hidrolisado Pepsina	Hidrolisado Endógeno
Ácido Aspártico	2,38	1,56	1,73
Ácido Glutâmico	3,38	2,39	3,40
Serina	1,20	0,84	0,24
Glicina	1,97	1,32	1,76
Histidina	0,58	0,46	0,31
Taurina	0,81	0,60	0,97
Arginina	1,96	1,33	0,47
Treonina	1,28	0,91	1,14
Alanina	1,94	1,38	1,92
Prolina	1,20	0,87	1,05
Tirosina	1,02	0,70	0,94
Valina	1,78	1,25	1,78
Metionina	0,82	0,55	0,83
Cistina	0,48	0,35	0,42
Isoleucina	1,26	0,91	1,36
Leucina	2,22	1,58	2,35
Fenilalanina	1,05	0,76	1,10
Lisina	1,23	1,29	1,73
Triptofano	0,71	0,64	0,92
Total de aminoácidos	27,27	19,69	24,42

Tabela 3 – Composição de aminoácidos livres dos hidrolisados (% de material seco).

Aminoácido (%)	Hidrolisado Protamex®	Hidrolisado Pepsina	Hidrolisado Endógena
Acido Aspartico	0,54	0,39	1,05
Acido Glutâmico	0,81	0,57	1,66
Serina	0,67	0,53	0,06
Glicina	0,47	0,30	0,87
Histidina	0,31	0,22	0,15
Taurina	0,53	0,48	0,63
Arginina	1,45	0,95	0,28
Treonina	0,60	0,47	0,79
Alanina	1,15	0,83	1,61
Prolina	0,25	0,38	0,50
Tirosina	0,77	0,58	0,80
Valina	1,01	0,74	1,42
Metionina	0,43	0,43	0,59
Cistina	0,44	0,42	0,56
Isoleucina	0,84	0,62	1,23
Leucina	1,54	1,16	2,09
Fenilalanina	0,70	0,52	0,92
Lisina	0,80	0,71	1,42
Asparagina	0,16	0,09	0,03
Glutamina	Não detectado	Não detectado	Não detectado
Total de aminoácidos	13,47	10,39	16,66

4.3.3 Distribuição de peso molecular dos peptídeos

O hidrolisado produzido com enzima endógena possui maiores quantidades de pequenos peptídeos (<1kDa). Entretanto a quantidade de peptídeos de 20 kDa a 5kDa foi inferior aos demais hidrolisados. O hidrolisado produzido com enzima pepsina resultou em maiores quantidades de peptídeos intermediários, na faixa de 20 kDa a 5 kDa. Os tamanhos de peptídeos mais presentes no hidrolisado produzido com Protamex foi de 2 a 5 kDa. As emulsões de todos os hidrolisados não possuem peptídeos acima de 100 kDa. Em comparação, as frações insolúveis possuem a maior proporção de peptídeos maiores que 100 kDa. A fração insolúvel do hidrolisado produzido com

enzima endógena foi a que resultou em maior teor de peptídeos menores do que 1 kDa e acima de 100 kDa.

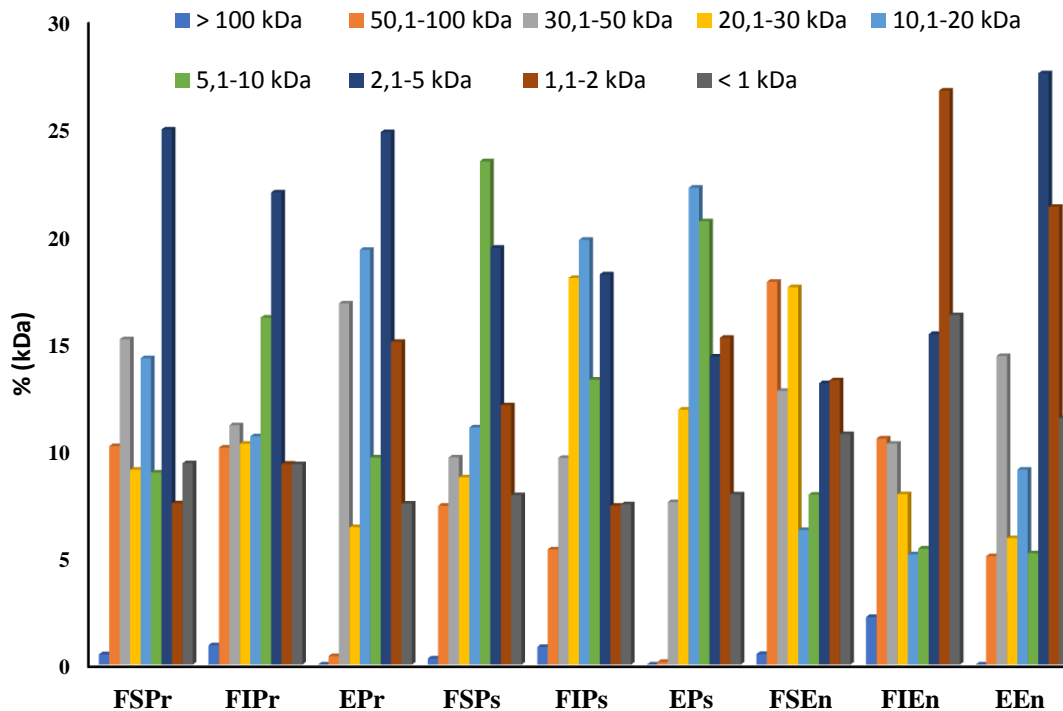


Figura 1 - Perfil de peptídeos das diferentes frações de hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.

FSPr: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima Protamex; FIPr: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima Protamex; EPr: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima Protamex; FSPs: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; FIPs: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; EPs: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; FSEn: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima endógenas; FIEn: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima endógenas; EEn: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima endógenas.

Tabela 4 – Perfis de peptídeos das diferentes frações de hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.

Peso Molecular	FSPr	FIPr	EPr	FSPs	FIPs	EPs	FSEn	FIEn	EEn
> 100 kDa	0,5	0,9	0,0	0,3	0,8	0,0	0,5	2,2	0,0
50,1-100 kDa	10,2	10,1	0,4	7,4	5,4	0,1	17,8	10,5	5,1
30,1-50 kDa	15,2	11,2	16,8	9,7	9,6	7,6	12,8	10,3	14,4
20,1-30 kDa	9,1	10,3	6,4	8,7	18,0	11,9	17,6	7,9	5,9
10,1-20 kDa	14,3	10,6	19,3	11,1	19,8	22,2	6,3	5,1	9,1
5,1-10 kDa	9,0	16,2	9,7	23,5	13,3	20,7	7,9	5,4	5,2
2,1-5 kDa	24,9	22,0	24,8	19,4	18,2	14,4	13,1	15,4	27,6
1,1-2 kDa	7,5	9,4	15,0	12,1	7,4	15,2	13,3	26,8	21,3
< 1 kDa	9,4	9,3	7,5	7,9	7,5	7,9	10,7	16,3	11,5

FSPr: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima Protamex; FIPr: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima Protamex; EPr: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima Protamex; FSPs: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; FIPs: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; EPs: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima pepsina suína; FSEn: Fração solúvel hidrolisado produzido com enzima endógenas; FSIn: Fração insolúvel hidrolisado produzido com enzima endógenas; EEn: Emulsão do hidrolisado produzido com enzima endógena.

4.3.4 Avaliação microbiológica

Todos os hidrolisados proteicos inibiram o crescimento das bactérias *Lactococcus* em comparação com o controle positivo MRS. Entretanto, ao ser realizada a comparação entre os diferentes hidrolisados, foi constatada diferença nos níveis de inibição. O hidrolisado de enzima endógena inibiu o crescimento das bactérias lácticas em níveis superiores ao hidrolisado de enzima Protamex.

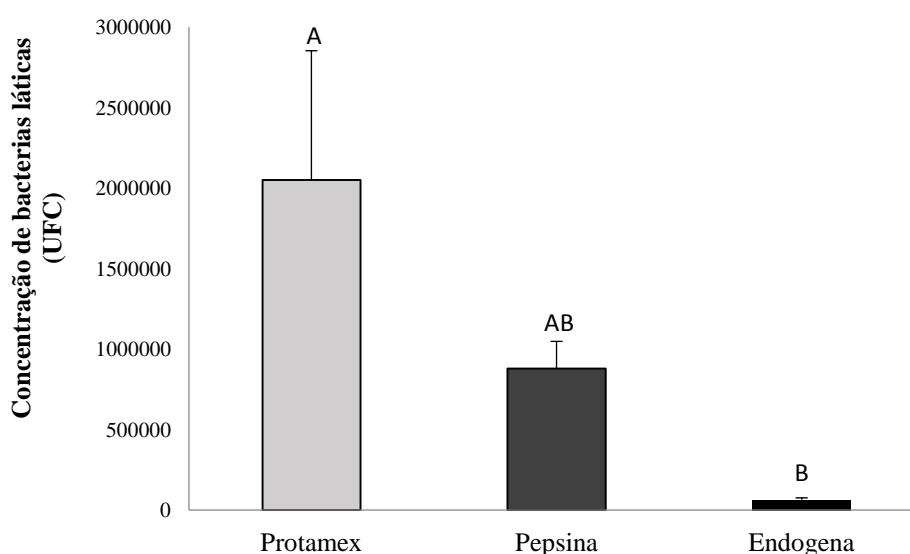


Figura 2 - Crescimento de bactérias do gênero *Lactococcus* em diferentes meios contendo hidrolisado proteico de vísceras de sardinha. Valores são médias \pm desvio padrão. Médias diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.4 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra a caracterização de três tipos diferentes de hidrolisado. As três enzimas utilizadas foram eficientes em produzir os hidrolisados proteicos. As descrições estão relacionadas aos parâmetros químicos de cada hidrolisado e não há comparações estatísticas. As análises de composição química revelaram semelhança entre os hidrolisados, o que era esperado, devido à utilização da mesma matéria-prima (CARREIRA et al., 2003). Os teores de MM estão dentro do intervalo comumente encontrado em hidrolisados de vísceras (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). As variações entre o ENN dos hidrolisados podem estar relacionadas ao conteúdo estomacal. As sardinhas são pequenos onívoros que se alimentam de microalgas, copépodes e outros crustáceos (CERGOLE; DIAS-NETO, 2011). Já foi sugerido em outros estudos alterações na caracterização química de hidrolisados de vísceras, devido ao conteúdo do trato digestório (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016). Por isso podem ocorrer variações nos lotes de matéria-prima devido à ingestão de nutrientes dos animais (HUSS, 1995).

Os níveis de proteína bruta e de lipídeos dos três hidrolisados são diferentes dos valores encontrados para hidrolisados de víscera de diversas espécies, tais como esturjão persa (*Acipenser persicus*) (65,82% PB, 0,18% EE) (OVISSIPOUR et al., 2009a), esturjão beluga (*Huso huso*) (68,43% PB, 1,34% EE) (OVISSIPOUR et al., 2009b), atum amarelo (*Thunnus albacares*) (72,34% PB, 1,43% EE) (OVISSIPOUR et al., 2012), truta arco-íris (88,32% PB, 0,80% EE) (*Onchorhynchus mykiss*) (TAHERI et al., 2012) e atum-bonito (*Katsuwonus pelamis*) (82,6-87,8%PB, 3,3-4,4% EE) (CHOTIKACHINDA et al., 2018). Esta variabilidade mencionada na composição química depende principalmente do tipo da espécie, sexo e idade dos animais (YEANNES e ALMANDOS, 2003). As grandes quantidades de PB e baixas porcentagens de EE relatados nestes estudos são devido ao processamento após hidrolise (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). Os hidrolisados comumente são centrifugados para concentração das proteínas solúveis, remoção da fração insolúvel (CHALAMAIAH et al., 2010) e eliminação da fração lipídica (CHALAMAIAH et al., 2012). A fração solúvel possui a maior concentração de proteína, com a maioria dos lipídios presentes na fração insolúvel (AMORIM, DESCHAMPS e PESSATTI, 2016). A fração solúvel do hidrolisado de vísceras de sardinha (*Sardinella sp.*) produzido com enzima Protamex® foi relatada com 61,4% PB e 1,69% EE (WOSNIAKI et al., 2016). Estes valores de proteínas são superiores aos demonstrados no presente estudo (36,65%

PB e 48,68% EE). Entretanto, a caracterização química descrita aqui foi realizada com o hidrolisado bruto. A finalidade dos presentes hidrolisados era manter a fração lipídica para resultar em ingredientes simultaneamente proteicos e energéticos. O óleo de peixe é o ingrediente mais utilizado como fonte lipídica na aquicultura, sendo uma excelente fonte de n-3 (SARGENT et al. 2002, OLIVA-TELES, 2012). As sardinhas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (VISENTAINER et al., 2000). Esta característica, juntamente com a possibilidade de diminuição na inclusão de óleo na dieta, torna interessante a manutenção da fração lipídica no hidrolisado.

O tipo da enzima utilizada influenciou no valor final dos GHs dos hidrolisados. Esta informação já foi demonstrada e comprovada através de estudos comparando diferentes enzimas para hidrolisar pescado (MARTINS, VIEIRA e PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; HERPANDI et al., 2012; CHAROENPHUN et al., 2013; BAEZ-SUAREZ et al., 2016). O grau de hidrólise é influenciado pela relação enzima-substrato, pH, temperatura e tempo de incubação (BENÍTEZ et al., 2008), além obviamente da especificidade da(s) enzima(s) e da abundância destes sítios de clivagem na matéria-prima (PASUPULETI; BRAUN, 2010). As enzimas utilizadas no presente experimento foram aplicadas conforme os resultados prévios de caracterização das enzimas (como no caso das enzimas endógenas), ou conforme as indicações do fabricante. Nas enzimas endógenas, apenas a razão enzima-substrato da autólise não foi estimada. Para mudar esta relação (enzima-substrato) seriam necessárias etapas prévias de concentração das proteases. Esta etapa previa não constituía o objetivo deste trabalho. A pergunta que foi proposta para ser respondida era se as enzimas endógenas em estado nativo seriam capazes de produzir um hidrolisado. O grau de hidrólise do autolisado deste estudo (9,9%) foi inferior aos GHs encontrados em testes demonstrado por Gonçalves et al. (2019 – Capítulo 2). Além das variações que podem ser comumente encontradas na matéria-prima, os autores citados utilizaram a fração solúvel para quantificar o GH, enquanto no presente estudo foi utilizado o hidrolisado bruto. A pepsina é uma endopeptidase adaptada para atuar em pH ácido (RAJARAM; NAZEER, 2010; VIEIRA et al., 1995). A acidez do pH pode levar a uma diminuição na recuperação proteica e diminuição da funcionalidade do hidrolisado, sendo um dos motivos apontados a formação de sais (KRISTINSSON; RASCO, 2000). A Protamex® por sua vez é uma mistura de endo e exopeptidases microbianas com atuação em pH neutro (KOUAKOU et al., 2014; LIASET et al., 2002,). Essas características fazem com que esta enzima tenha uma maior amplitude de atuação do que a pepsina, sugerindo um GH superior,

porém a natureza da proteína do substrato também deve ser considerada (QARA; NAJAFI, 2018).

Os diferentes perfis de peso molecular revelaram alterações consideráveis no grau de quebra da proteína, constatando que o tipo da enzima utilizada fez influencia nessa característica (ALEMÁN et al., 2011). As endopeptidases agem preferencialmente nas porções mais internas da cadeia polipeptídicas (TORRUCO-UCO et al., 2008). Este aspecto ajuda a explicar o motivo da enzima Pepsina ter hidrolisado maiores quantidades de peptídeos intermediários. A enzima Protamex® foi mais eficiente do que a pepsina, demonstrando um perfil mais variado de peptídeos. Esta característica pode estar relacionada ao fato da Protamex® ser uma mistura de enzimas, como já citado, ocorrendo quebras com endo e exopeptidases. As exopeptidases hidrolisam as extremidades da cadeia (VAŠTAG et al., 2011), podendo resultar em bandas de alto e baixo peso molecular no perfil eletroforético. O peso molecular de hidrolisados de peixe Kilka (*Clupeonella cultriventris caspi*) produzido com enzima pepsina foi superior ao de hidrolisado produzido com Protamex®, que se encontravam com peso na faixa de 30kDa em baixo GH (QARA; NAJAFI, 2018). O perfil de peptídeos de hidrolisados de víscera de sardinha produzidos com Alcalase® com GH de 10,16% foi investigado e resultou em peptídeos com 55kDa, 30kDa e tamanhos menores do que 14,2kDa (SOUISSI et al., 2007). Estes resultados corroboram com os tamanhos de peptídeos encontrados para as enzimas comerciais do presente estudo. Os hidrolisados produzidos com enzimas endógenas desta investigação resultaram em peptídeos de menor tamanho. Aproximadamente 52% dos peptídeos possuíam menos do que 5 kDa. Este valor é muito expressivo ao levar em consideração o GH de 9,9% dos hidrolisados produzidos com enzima endógena. Silva et al. (2014), ao investigar as enzimas endógenas da tilápia do Nilo, constataram que a maior parte da proteína foi quebrada em peptídeos menores do que 20 kDa com GH de 41,66%. Também foi necessário um GH acima de 40% para conseguir um perfil de peptídeos de baixo peso molecular utilizando enzimas comerciais para hidrolisar vísceras de carpa indiana (*Catla catla*) (BHASKAR et al., 2008) e esturjão persa (*Acipenser persicus*) (OVISSIPOUR et al., 2009a).

A diferença do perfil molecular das frações solúveis, insolúveis e emulsão foi mais evidente no hidrolisado de enzima endógena. As frações solúveis possuem uma maior variação de tamanhos de peptídeos. Trata-se de um produto da hidrólise de proteínas e peptídeos, gerando maior exposição de grupos ionizáveis e polares na superfície da proteína, o que influencia a melhora de sua capacidade de formar ligações

de hidrogênio com a água (HE et al., 2013; YIN et al., 2008). As frações insolúveis são constituídas por grandes e pequenos peptídeos. Os peptídeos e aminoácidos livres hidrofóbicos constituem essa fração (LIASET; ESPE, 2008). Os aminoácidos hidrofóbicos podem representar um sabor amargo no hidrolisado (HALL; AHMAD, 1992). A emulsão é composta por peptídeos com estrutura anfipática que facilita a absorção óleo-água (PIRES; BATISTA, 2013). Essa característica dos hidrolisados é influenciada principalmente pelo tamanho e peso molecular dos peptídeos e aminoácidos, hidrofobicidade de superfície, solubilidade e tipo de enzima (LIU et al., 2014).

O perfil de aminoácidos dos hidrolisados revelou que apresentam todos os aminoácidos essenciais e não-essenciais. Os aminoácidos glutamina e asparagina não constituem a planilha de resultados porque durante as análises são convertidos em ácido glutâmico e ácido aspártico. Entretanto todos estes aminoácidos são não-essenciais. Os três hidrolisados de vísceras de sardinha possuem perfil de aminoácidos semelhante ao de outras espécies de peixes (BHASKAR et al., 2008; HORN; ASPMO; EIJSINK, 2005; OVISSIPOUR et al., 2009; OVISSIPOUR et al., 2012). As diferenças encontradas são principalmente devido a natureza da matéria-prima, tipo de enzima e parâmetros de hidrólise utilizados (KLOMPONG et al., 2009). O perfil de aminoácidos da fração solúvel de hidrolisados de vísceras industriais de sardinha já foi relatado e considerado apto para aquicultura (WOSNIAK et al., 2016). Apesar de constituir a mesma matéria-prima, comparações devem ser feitas com reservas, pois as amostras do presente trabalho são baseadas no hidrolisado bruto, enquanto Wosniak et al. (2016) trabalharam com frações. Todos os hidrolisados apresentaram arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Esses 10 aminoácidos são essenciais para formulações de dietas voltadas para aquicultura (NRC, 2011).

O hidrolisado de enzimas endógenas possui maiores quantidades de aminoácidos livres do que os hidrolisados produzidos com Protamex® e pepsina. Esta característica está relacionada ao fato deste hidrolisado ter maiores quantidades de pequenos peptídeos. Mas muitos dos aminoácidos livres do hidrolisado de enzima endógena são hidrofóbicos. Esta característica também é demonstrada pela maior presença de pequenos peptídeos na fração insolúvel e na emulsão deste hidrolisado. Os aminoácidos hidrofóbicos presentes, como os de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina), podem ser responsáveis em ocasionar sabor amargo no hidrolisado criando um problema na utilização de dietas (BOUGATEF et al., 2008). Entretanto, no hidrolisado

de enzima endógena há também outros aminoácidos livres se destacando, os quais podem melhorar a palatabilidade, como a glicina e lisina (TESSER; PORTELLA, 2011), ácido glutâmico e ácido aspártico (HISANO et al., 2007).

Os hidrolisados do presente estudo inibiram o crescimento de bactérias lácticas em comparação com o meio de cultura MRS. A expectativa era de que os hidrolisados promovessem o crescimento destas bactérias, consideradas benéficas. Outros estudos já relataram que hidrolisados de pescado são eficazes em promover o crescimento de bactérias lácticas em níveis superiores aos meios comerciais MRS (SAFARI et al., 2012). Souissi et al. (2018) investigaram a propriedade promotora de crescimento bacteriano em hidrolisados de *Sardinella aurita*, com GHs de 12 e 26%, mas com níveis acima de 60% de proteína. A utilização de enzimas endógenas para conseguir crescimento de bactérias lácticas, também já foi demonstrado com hidrólise de vísceras de tilápia, utilizando pHs de hidrólise abaixo de 6,2 e tempos de hidrólise de 8 a 20 horas (DERAZ et al., 2011).

Diversos fatores podem influenciar na atividade microbiana, tais como o perfil de peptídeos, os aminoácidos livres, as diferentes características durante a hidrólise, os tipos de enzimas utilizadas, o grau de hidrólise, aptidão como meio de cultura (KLOMPONG et al., 2012) e variação sazonal das vísceras de peixes (HORN; ASPMO; EIJSINK, 2007). Desta forma, percebe-se que é um conjunto de características complexas que resultam em um hidrolisado com capacidade prebiótica. É importante destacar que os estudos citados utilizaram a fração solúvel como fonte de nitrogênio para meios de crescimento microbiano. Os testes com os hidrolisados deste estudo utilizaram material bruto, de forma que a porcentagem proteica era menor, havia teor importante de lipídios e grandes quantidades de aminoácidos hidrofóbicos. Somados, estes fatores podem ter limitado a proliferação de micro-organismos lácticos.

As características inibitórias dos hidrolisados deste estudo também podem ser discutidas de forma positiva. Ocorreram variações entre as inibições dos hidrolisados. Apesar dos hidrolisados terem apresentado características inibitórias de micro-organismos lácticos, é necessário que estes estudos sejam repetidos para avaliar as atividades inibitórias em micro-organismos patogênicos para a piscicultura. Hidrolisados de truta arco-íris produzidos com enzimas endógenas (pepsina isolada) com GH de 30%, resultaram em efeito antibacteriano contra organismos presentes em pisciculturas (*Flavobacterium psychrophilum* e *Renibacterium salmoninarum*) (WALD et al., 2016). As diferenças de inibição entre os hidrolisados do presente estudo podem

estar relacionadas ao perfil dos peptídeos. A atividade antimicrobiana de hidrolisados proteicos de kilka (*Clupeonella cultriventris caspi*) revelou que hidrolisados produzidos com Alcalase e Neutrase (tamanho de 10kDa), resultaram em maior poder inibitório do que hidrolisados de pepsina e Protamex® (tamanho de 30kDa) (QARA;NAJAFI, 2018). O modo de ação e a especificidade dos peptídeos antibacterianos estão intimamente relacionados com as diferenças existentes na composição da membrana do microrganismo alvo (HANCOCK; PATRZYKAT, 2002), reforçando a necessidade de futuros estudos com aprofundamento neste tema.

A utilização da víscera industrial de sardinha possui alguns problemas de padronização da matéria-prima que podem influenciar no uso do hidrolisado como ingrediente. As características químicas e o perfil de peptídeos e aminoácidos descritos neste artigo são promissoras e demonstram potencial para a aquicultura. Desta forma, torna-se interessante a realização futura de testes nutricionais em organismos aquáticos.

4.5 CONCLUSÃO

A caracterização dos hidrolisados foi influenciada pelo tipo da enzima utilizada.

A quantidade de nutrientes e o perfil de aminoácidos dos hidrolisados indicam que eles podem ser utilizados na aquicultura.

A enzima Protamex® produziu um hidrolisado com um perfil de peptídeos mais equilibrado.

As enzimas endógenas produziram um hidrolisado com maiores quantidades de aminoácidos hidrofóbicos livres e peptídeos de baixo peso molecular.

O perfil de peptídeos sobre variações nas diferentes frações dos hidrolisados.

Com esta caracterização, os hidrolisados brutos inibiram o crescimento de bactérias lácticas.

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzyme hydrolysis of food proteins**. England: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427p.

ALEMÁN, A.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 407- 413, 2011.

AMORIM, R. G. O.; DESCHAMPS, F. C.; PESSATTI, M. L. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 967-974, 2016 .

BAEZ-SUAREZ, A. J.; OSPINA-DE-BARRENECHE, N.; ZAPATA-MONTOYA, J. E. Efecto de Temperatura, pH, Concentración de Sustrato y Tipo de Enzima en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*). **Información tecnológica**, v 27, n.6, p. 63-76, 2016.

BENÍTEZ, R.; IBARZ RIBAS, A.; PAGAN I, GILABERT, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 42.n. 2, p. 227-236, 2008.

BENJAKUL, S.; YARNPAKDEE, S.; SENPHAN, T., HALLDORSOTTIR, S. M.; KRISTINSSON, H. G. Fish protein hydrolysates: production, bioactivities and applications. **Antioxidants and functional components in aquatic foods**, 1st ed. Reykjavik, Iceland: Matil Ltd , p. 237-281, 2014.

BHASKAR, N.; BENILA, T.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource technology**, v. 99, n.2, p. 335-343, 2008.

BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; RAVALLEC-PLÉ, R.; LEROY, Y.; GUILLOCHON, D.; BARKIA, A.; NASRI, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food chemistry**, v. 111.n 2, p. 350-356, 2008.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. **Ciênc. agrotec.**, v. 27, n. 3, p. 625-634, 2003.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. (Org.). **Plano de gestão para o uso sustentável de Sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2011. 180 p.

CHALAMAIAH, M.; RAO, G. N.; RAO, D. G.; JYOTHIRMAYI, T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, v. 120, n.3, p. 652-657, 2010.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p.3020-3038, 2012.

CHAROENPHUN, N.; CHEIRSILP, B.; SIRINUPONG, N.; YOURAVONG, W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **European Food Research and Technology**, v. 236, n 1, p.57-63, 2013.

CHOTIKACHINDA, R.; TANTIKITTI, C.; BENJAKUL, S.; RUSTAD, T. Tuna viscera hydrolysate products prepared by different enzyme preparations improve the feed intake and growth of Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed total fishmeal replacement diets. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 40, n.1, 2018.

DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ABD-ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* fish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n..2, p. 171-175, 2011.

DUAN, Z. H.; WANG, J. L.; YI, M. H.; YIN, A. Q. Recovery of proteins from silver carp by-products with enzymatic hydrolysis and reduction of bitterness in hydrolysate. **Journal of food process engineering**, v. 33, n.5, p. 962-978, 2010.

DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current microbiology**, v. 42, n.1. p. 32-38, 2001.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAU, M. E.; BERGÉ, J. P. Optimization of hydrolysis of sardine

(*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **J Sci Food Agric**, v. 89, p.1599-1606, 2009.

ENNAS, N.; HAMMAMI, R.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p. 195-200, 2015.

FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 19, p.79-89, 2002.

HA, N. ; JESUS, G. F. A. ; GONCALVES, A. F. N. ; OLIVEIRA, N. S. ; SUGAI, J. K. ; PESSATTI, M. L. ; FABREGAT, T. E. H. P. . Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture** , v.500, p. 99-106, 2019.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n..6, . p. 912-916, 1989.

HALL, G. M.; AHMAD, N. H. **Functional properties of fish protein hydrolysates**. In: HALL, G. M. *Fish Processing Technology*. Black Academic & Professional. New York: VCH Publishers, p. 248-274, 1992

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. **Current drug targets- Infectious disorders** , v.2, n.1, p.79-83, 2002.

HE, R.; ALASHI, A.; MALOMO, S. A.; GIRGIH, A. T.; CHAO, D.; JU, X.; ALUKO, R. E. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 141, p. 153-159, 2013.

HERPANDI, H.; HUDA, N.; ROSMA, A.; WAN NADIA, W. A. Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. **International Food Research Journal**. v. 19, n.3, p. 863-867, 2012.

HISANO, H.; NARVÁEZ-SOLARTE, W. V. N.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira Journal of Applied Microbiology**, v. 42, n 7, p. 1035-1042, 2007.

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. H. **Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera.** *J. Appl. Microbiol.* p. 1082-1089, 2005

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v 40, n.5, p. 1328-1334, 2007.

HORWITZ, W. *Official methods of analysis*. v.222. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1975.

HUSS, H. H. *Quality and quality changes in fresh fish*. v. 348. Rome: FAO, 1995.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; YACHAI, M.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F.; HAYES, K. D. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). **J. Food Sci.**, v. 74, p. 126-133, 2009.

KLOMPONG, V., BENJAKUL, S., KANTACHOTE, D., & SHAHIDI, F. **Use of protein hydrolysate from yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as microbial media.** *Food and bioprocess technology*, v. 5, n. 4, p. 1317-1327, 2012

KOUAKOU, C.; BERGE, J. P.; BARON, R.; LETHUAUT, L.; PROST, C.; CARDINAL, M. Odour modification in salmon hydrolysates using the Maillard reaction. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 23, n. 5, p. 453-467, 2014

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p.43-81, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227 n. 5259, p.680-685, 1970.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technol.**, Chicago, v.48, n.10, p. 68-71, 1994.

LIASET, B., JULSHAMN, K., & ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. **Process Biochemistry**, v. 38, n.12, p. 1747-1759, 2003

LIASET, B., & ESPE, M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**, v.43, n.1, p. 42-48, 2008.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. **Process Biochemistry**, v.37, p. 1263-1269, 2002.

LIU, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; YU, J.; WANG, F.; WANG, J. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food chemistry**, v. 151, p. 459-465, 2014.

LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, v. 109, n.1, p. 192-197, 1980.

MAHMOUD, M.I., Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technol.** V. 48, p. 89-95, 1994.

MAIZ, H.; GUADIX, E.; GUADIX, A.; GARGOURI, M.; ESPEJO-CARPIO, F. Valorisation of tuna viscera by endogenous enzymatic treatment. **International Journal of Food & Science Technology**, 2018.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O. CHAMORRO, S., Brenes, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Res. Int.**, v. 73, p. 204-212, 2015.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; HERNANDEZ, C. P. **Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina**, p. 61-66, 2009.

NAKAJIMA, K.; YOSHIE-STARK, Y.; OGUSHI, M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 114, n.3, p. 844-851, 2009.

NAZEER, R. A.; DEEPTHA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyraena barracuda*) and

Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209-216, 2011 .

NEVES, R. A. M. **Hidrolisados proteicos de pescado: caracterização e proposta de uso como suporte nutricional.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2001.

NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp.** Washington, USA: National academies press, 2011.

NILSEN, P. M., PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Food Chem. Toxicol.**, v.66, p. 642-646, 2001.

NGUYEN, H. T. M.; PÉREZ-GÁLVEZ, R.; BERGÉ, J. P. Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.324, p. 127-134, 2012.

OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, p.361 1980.

OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. **Journal of fish diseases**, v.35, n.2, p. 83-108, 2012

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R., & SHAHIRI, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**, v. 115, n1, p.238-242, 2009.

OVISSIPOUR, M.; KENARI, A. A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; NAZARI, R. M. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Food and bioprocess technology**, v. 5, n.2, p. 696-705, 2012.

OVISSIPOUR, M.; TAGHIOF, M.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; MOLLA, A. E. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. **International Aquatic Research**, v.1, n.1, p.31-38, 2009.

PASUPULETI, V. K.; BRAUN, S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. **Protein hydrolysates in biotechnology**. Springer, Dordrecht, p.11-32, 2008.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA JR, J.; BERNÁRDEZ, M. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 83-88, 2003.

PIRES, C.; I. BATISTA; R. PÉREZ-GÁLVEZ, J.P. BERGÉ. **Functional properties of fish protein hydrolysates**. Utilization of fish waste, CRC Press, Boca Raton, FL, 2013, p. 59-75.

QARA, S.; NAJAFI, M. B. H. Bioactive properties of Kilka (*Clupeonella cultriventris caspi*) fish protein hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2263-2270, 2018.

RAJARAM, D.; NAZEER, R. A. Antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from marine fishes *Lepturacanthus savala* and *Sphyraena barracuda*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, p. 435-444, 2010.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J. M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food Bioprocess Technol.**, v. 5, p. 73-79, 2012.

SAMARANAYAKA, A. G.; LI-CHAN, E. C. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of functional foods**, v. 3, n.4, p. 229-254, 2011.

SARGENT J.R.; TOCHER D.R.; BELL J. G. The lipids. In: *Fish Nutrition*, 3rd edn (ed. by J.E. Halver & R.W. Hardy). **Academic Press**, San Diego, CA, p. 181-257, 2002.

SARMADI, B. H., & ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, v.31, n.10, p. 1949-1956, 2010.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.

SCHAGGER, H., **Tricine-sds-page**. *Nature protocols* 1, 16. DOI: 10.1038/nprot,2006

SILVA; J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHU, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96-106, 2014.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food technology and biotechnology**, v. 45, n. .2, p. 187, 2007.

SOUISSI, N.; JRIDI, M.; SLAMA, R. B.; REBAH, F. B., NASRI, M. Sardinelle by-product hydrolyzates as nitrogen source for microbial growth and protease production. **Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)**, v.17,n.11, 2018.

SUN, X.; CHAKRABARTI, S.; FANG, J.; YIN, Y.; WU, J. Low-molecular-weight fractions of Alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor–mediated nuclear factor κ B pathway. **Nutrition Research**, v. 36, n.7, p. 648-657, 2016.

TAHERI, A.; ANVAR, S. A. A.; AHARI, H.; FOGLIANO, V. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 12, n.1, p. 154-169, 2013.

TESSER, M. B., PORTELLA, M. C. Estimulantes alimentares para larvas de pacu. **Revista Brasileira Zootecnia**, 2011.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMINGUEZ-MAGANA, M. A.; DAVILA-ORTIZ, G.; MARTINEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCUR-ANCONA, D. A. Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review. **Ciencia y Tecnologia Alimentaria**, v. 6, n.2, p.158-168, 2008.

TOSSAVAINEN, O.; SYVAEOJA, E. L.; TUOMINEN, J.; HEINÄNEN, M.; KALKKINEN, N. Determination of the peptide size range of an extensively hydrolysed protein hydrolysate. **Milchwissenschaft** , p. 63-67, 1997.

VAŠTAG, Ž.; POPOVIĆ, L.; POPOVIĆ, S.; KRIMER, V.; PERIČIN, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. **Food Chemistry**, v.124 , n.4, p. 1316-1321, 2011.

VIEIRA, G. H. F.; MARTIN, A. M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; OMAR, S.; GONCALVES, R. C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. **J Sci Food Agric**, v. 69, p. 61-65, 1995.

VILLAMIL, O., VÁQUIRO, H., & SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

VISENTAINER, J. V.; CARVALHO, P. D. O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.1, p. 90-93, 2000.

VON DER DECKEN, A.; ESPE, M.; LIED, E; LIE, Ø.; HUSE, I.; RINGØ, E.; HAALAND, H .Effects of pre-digested protein intake on growth and muscle metabolic parameters in atlantic salmon *salmo salar*. **Fiskeridirektoratets Skrifter**, v.5, n.1, p. 1-9, 1992.

WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H.; BUBMANN, B.; BEERMANN, C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. **Food Chemistry**, v.205, p. 221-228, 2016.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 8, n.4, 170-177, 1986.

WOSNIAK, B.; MELIM, E. W. H.; HA, N.; UCZAY, J.; PILATTI, C.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, 2016.

YEANNES, M. I.; ALMANDOS, M. E. Estimation of fish proximate composition starting from water content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, n.1 , p. 81-92, 2003

YIN, S. W.; TANG, C. H.; WEN, Q. B.; YANG, X. Q.; LI, L. Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate: effect of high-pressure treatment. **Food chemistry**, v. 110, n.4, p. 938-945, 2008.

ZAMORA-SILLERO, J.; KÜTTER, M. T.; TESSER, M. B.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 110-118, 2018.

5 CAPÍTULO 4 – O TIPO DE ENZIMA UTILIZADA NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE VÍSCERA DE SARDINHA INFLUENCIA NA PALATABILIDADE DA DIETA, DESEMPENHO PRODUTIVO E NO APROVEITAMENTO DA PROTEÍNA DE JUVENIS DE TRUTAS ARCO-ÍRIS

RESUMO

O hidrolisado proteico de pescado é um ingrediente altamente digestível, fornecendo aminoácidos livres e peptídeos de diversos tamanhos, facilitando a absorção pelo trato gastrointestinal. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das enzimas exógenas e endógenas na produção de hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha e sua influência no desempenho produtivo, hematologia, metabolismo proteico e atividade de proteases digestivas de trutas arco-íris. As enzimas testadas para produzir os hidrolisados foram Protamex, pepsina suína e enzimas endógenas do trato digestivo da sardinha. Foi utilizada uma dieta contendo farinha de peixe como grupo controle. As ferramentas de avaliação foram o desempenho produtivo, a dinâmica das reservas energéticas teciduais, o perfil de metabólitos no sangue, a atividade das vias metabólicas hepáticas, e as enzimas digestivas. Foram utilizados 300 juvenis de trutas arco-íris, divididos em 20 caixas de polietileno com capacidade para 100 L de água, resultando em 15 juvenis de truta arco-íris por unidade experimental. O ensaio teve a duração de 56 dias e o delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Foi verificada a normalidade e homocedasticidade, posteriormente foi realizado a análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%). As dietas contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex e as dietas contendo hidrolisado produzido com pepsina suína, não diferiram ($P > 0,05$) da dieta Controle, proporcionando os melhores resultados de ganho de peso e taxa de crescimento específico. A dieta controle foi a mais consumida pelas trutas. O hidrolisado produzidos com enzimas endógenas de sardinha são pouco palatáveis, mesmo em relação aos outros hidrolisados. Este hidrolisado prejudica o crescimento e a fisiologia de juvenis de trutas arco-íris. As diferenças relacionadas as reservas energéticas e algumas diferenças nos parâmetros sanguíneos, foram influenciados pelo consumo. A enzima Protamex e a pepsina suína produziram hidrolisados que estimularam as Proteases alcalinas totais. Variações na síntese de aminoácidos foram observadas pela enzima AST. Pode-se concluir que os hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha são pouco palatáveis para trutas arco-íris e influenciaram no desempenho e respostas fisiológicas dos animais.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; Hidrolisado proteico; Palatabilidade; Autólise; *Oncorhynchus mykiss*; *Sardinella*

5.1 INTRODUÇÃO

A *Sardinella* sp. esta entre as quatro espécies/gênero mais capturadas do mundo, com valores totais de pesca em torno de 2.289.830 toneladas (FAO, 2018). Deste montante capturado, a produção de resíduo industrial pode chegar a 70% (OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014). O desconhecimento sobre a utilização dos resíduos e os benefícios que eles proporcionam, resultam em grandes quantidades de descarte (EZEJIOFOR, ENEBAKU; OGUEKE, 2014). O descarte desses resíduos provocam perdas econômicas e problemas ambientais (SHERIFF et al., 2014). Há necessidade de aprimoramento de técnicas para recuperar estes nutrientes e biomoléculas dos subprodutos (ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). O hidrolisado proteico de pescado é uma alternativa para agregar valor econômico para estes resíduos (VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017).

O processo de hidrólise consiste em degradar as proteínas em peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres (LIASET et al., 2000). Os peptídeos de baixo peso molecular podem melhorar a palatabilidade das dietas (OLIVA-TELES et al., 1999) e são absorvidos e digeridos mais facilmente pelo organismo dos animais (BAKKE et al., 2010). O hidrolisado proteico utilizado na aquicultura pode melhorar o desempenho produtivo de variadas espécies de peixe (BUI et al., 2014; KHOSRAVI et al., 2014; COSTA-BOMFIM et al., 2016; CHOTIKACHINDA et al., 2018); causar melhoras em índices hematológicos e imunológicos (LORENZ et al., 2018); possuir atividade microbiológica (DERAZ et al., 2011; SAFARI et al., 2012); estimular efeito prebiótico e aumento de enzimas digestivas (HA et al., 2019).

A possibilidade de seleção do tipo de enzimas proteolíticas permite a produção de hidrolisados com diferentes estruturas moleculares e diferentes propriedades funcionais (ONODENALORE; SHAHIDI, 1996; ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). A variação de estruturas moleculares pode alterar a fisiologia do animal, pois estes peptídeos são absorvidos de forma intacta e entram na corrente sanguínea (RYAN et al., 2011). O desequilíbrio na proporção e quantidade dos peptídeos influencia no crescimento do animal (AKNES et al., 2006). Diversas enzimas comerciais podem ser utilizadas na hidrólise de pescado (CHALAMAIAH et al., 2012). Entre as principais escolhas temos a Protamex® (AMORIM; DESCHAMPS; PESSATTI, 2016), cuja a sua eficiência já foi comprovada para a produção de hidrolisado proteico de vísceras de sardinha (WOSNIAK et al.,

2016). A pepsina é uma alternativa para produção de hidrolisados de pescado (NAZEER et al., 2011; VIEIRA et al., 1995) e já foi comparada a enzima Protamex®, resultando em hidrolisados com algumas caracterizações semelhantes (QARA ; NAJAFI, 2018).

A produção de hidrolisados de proteínas de peixe também pode ser realizada utilizando um processo autolítico utilizando as enzimas digestivas do próprio peixe (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Trata-se de uma operação sem custos com enzimas comerciais (MAIZ et al., 2018; SHAHIDI; HAN ; SYNOWIECKI, 1995). Resultados promissores foram encontrados com hidrolisados produzidos com enzimas endógenas de raia-lenga (*Raja clavata*) (PASTORIZA et al., 2003), bacalhau (*Gadus morhua*) (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005), tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (SILVA et al., 2014) e atum-bala (*Auxis rochei*) (MAIZ et al., 2018).

O hidrolisado proteico de pescado já foi descrito como ingrediente substituto da farinha de peixe na alimentação de trutas arco-íris, sem interferir na saúde dos animais (BAE et al., 2019). Entretanto, podem ocasionar uma maior excreção de amônia (AGUIRRE et al. 1995). Alguns autores afirmam que proteínas parcialmente hidrolisadas, com níveis altos de aminoácidos livres, podem ser utilizadas mais eficientemente pelas trutas arco-íris (DONG et al. 1993 ; HARDY 2002). Porém, mais importante do que os aminoácidos livres, destacam-se os peptídeos de baixo peso molecular (BAKKE et al., 2010). Hidrolisados sem peptídeos de baixo peso molecular, já foram relatados como ineficientes no crescimento destes animais (AKSNES et al., 2006).

A truta arco-íris é uma das espécies mais importantes para a aquicultura mundial, e também é amplamente utilizada como modelo biológico em diversas áreas de pesquisa (BERTHELOT et al. al. 2014; THORGAARD et al. 2002). De acordo com nossas observações, não há muitos estudos demonstrando a influencia do consumo de hidrolisados na atividade das enzimas do metabolismo intermediário de peixes. Desta forma, a utilização do hidrolisado proteico de víscera de sardinha como ingrediente alternativo na alimentação de truta arco-íris torna-se interessante. A influencia dos compostos de baixo peso molecular na fisiologia e metabolismo dos animais pode ser melhor compreendida. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito das enzimas exógenas e endógenas na produção de hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha, e sua influência no desempenho produtivo, hematologia, metabolismo proteico e atividade de proteases digestivas de trutas arco-íris.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de piscicultura do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, localizada em Lages, Santa Catarina, Brasil. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições. Os diferentes tratamentos foram: dieta controle; dieta contendo hidrolisado produzido com Protamex (HP); dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína (HS) e dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas (HE). Foram utilizados 300 juvenis de trutas arco-íris ($3,76 \pm 0,77$ g) divididos em 20 caixas de polietileno com capacidade para 100L de água. As caixas estavam dispostas em um sistema fechado de recirculação de água com filtros mecânicos e biológicos. A instalação possuía compressor de ar para promover adequada concentração de oxigênio dissolvido às caixas de polietileno. O experimento foi realizado em temperatura ambiente. Foi utilizado um temporizador digital para acionamento das lâmpadas e manutenção do fotoperíodo com 12 horas de iluminação. As caixas foram cobertas com tampas de tela plástica. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UDESC.

5.2.1 Produção e caracterização dos hidrolisados

Os hidrolisados foram produzidos no Laboratório de Bioquímica e Bromatologia da Universidade do Vale do Itajaí. Os resíduos de pescados utilizados como matéria-prima consistiam em vísceras frescas de sardinha (*Sardinella* sp.). Os subprodutos foram provenientes da GDC Alimentos S.A, localizada em Itajaí, Santa Catarina, Brasil, e da Camil Alimentos S.A, localizada em Navegantes, Santa Catarina, Brasil.

Foram produzidos três tipos de hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha. O que diferenciou os hidrolisados foi o tipo de enzima utilizada para a produção individual de cada produto. As enzimas utilizadas foram: Protamex® (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca), Pepsina suína (Bela Vista Produtos Enzimáticos, Alto Bela Vista, Santa Catarina, Brasil) e as Enzimas Endógenas do trato digestivo das sardinhas.

Os três hidrolisado foram produzidos de acordo com Gonçalves et al. (2019 – Capítulo 3). A produção do hidrolisado Protamex® utilizou água destilada na proporção de 1:1, concentração 1:500 E/P (Enzima/Pescado), incubação à 55°C por 90 minutos. O hidrolisado produzido a partir de pepsina suína utilizou tampão ácido clorídrico - cloreto de potássio (0,1M, pH 2,0) na proporção 1:1, concentração de 1:500

E/P, incubação à 37°C por 210 minutos. A produção de hidrolisado com enzimas endógenas do próprio trato digestório das sardinhas (autólise) utilizou tampão citrato-fosfato (0,15M, pH 8,4) na proporção 1:1, incubação à 42°C por 240 minutos. Ao término das hidrolises todas as enzimas foram inativadas com alta temperatura (85°C) e os hidrolisados foram secos em estufa a 60°C.

As análises de composição química dos hidrolisados, juntamente com o perfil de peptídeos e de aminoácidos são descritos por Gonçalves et al. (2019 – Capítulo 3).

A composição bromatológica seguiu a metodologia de Horwitz (2000). Consistem em: matéria seca (MS%, determinado por radiação infravermelha), proteína bruta (PB%, método de Kjeldhal), extrato etéreo (EE%, método de Soxhlet), cinzas (MM%, incineração em mufla à 550-600°C), extrativo não nitrogenado (%ENN, calculado) e energia bruta (EB kcal/kg, calculado).

A determinação do grau de hidrólise (GH) utilizou a metodologia adaptada de Nielsen et al. (2001), explorando-se a reatividade do “o-phthaldialdehyde” (OPA) com amino-grupos. As análises foram realizadas em leitor de microplacas modelo Genius, marca Tecan, em absorvância de 340 nm. O resultado foi expresso como GH(%), através da equação:

$$\text{GH (\%)} = [(\text{Serina-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv} / \text{g proteína}] / \text{htot} * 100$$

Os valores de α , β e htot utilizados são os determinados previamente por Adler-Nissen (1986) para pescado: 1,00; 0,40 e 8,6, respectivamente.

As composições de aminoácidos e aminoácidos livres foram realizadas seguindo a metodologia de Hagen; Frost; Augustin (1989) e White; Hart; Fry (1986), e a determinação de triptofano de acordo com Lucas; Soutelo (1980).

A determinação e distribuição de peso molecular dos peptídeos presentes nos hidrolisados foram realizadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Tricina-SDS-PAGE 16% resolving gel, spacer gel 10%, stacking gel 4%), conforme Schägger (2006).

Tabela 1 – Composição bromatológica e grau de hidrólise dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.

Amostra	MS%	PB%*	EE%*	MM%*	%ENN*	EB (kcal/kg)*	GH%
Protamex	63,48	36,65	48,69	10,57	4,09	6.559,5	19,9
Pepsina	52,85	31,02	52,30	9,21	7,47	6.708,7	17,6
Endogena	67,97	34,80	45,29	10,01	9,90	6.390,8	9,9

MS% matéria seca (amostra in natura); PB% proteína bruta; EE% extrato etéreo; MM% cinzas; %ENN extrativo não nitrogenado; EB energia bruta; GH grau de hidrólise. Análises em MS%.

Tabela 2 – Composição de aminoácidos livres dos hidrolisados (% de material seco).

Aminoácido (%)	Hidrolisado Protamex®	Hidrolisado Pepsina	Hidrolisado Endógena
Acido Aspartico	0,54	0,39	1,05
Acido Glutâmico	0,81	0,57	1,66
Serina	0,67	0,53	0,06
Glicina	0,47	0,30	0,87
Histidina	0,31	0,22	0,15
Taurina	0,53	0,48	0,63
Arginina	1,45	0,95	0,28
Treonina	0,60	0,47	0,79
Alanina	1,15	0,83	1,61
Prolina	0,25	0,38	0,50
Tirosina	0,77	0,58	0,80
Valina	1,01	0,74	1,42
Metionina	0,43	0,43	0,59
Cistina	0,44	0,42	0,56
Isoleucina	0,84	0,62	1,23
Leucina	1,54	1,16	2,09
Fenilalanina	0,70	0,52	0,92
Lisina	0,80	0,71	1,42
Asparagina	0,16	0,09	0,03
Glutamina	Não detectado	Não detectado	Não detectado
Total de aminoácidos	13,47	10,39	16,66

Tabela 3 – Perfis de peptídeos dos hidrolisados de vísceras de sardinha produzidos com diferentes enzimas.

Peso Molecular	Protamex	Pepsina	Endógena
> 100 kDa	0,73	0,62	1,60
50,1-100 kDa	9,77	5,80	12,58
30,1-50 kDa	12,60	9,56	11,20
20,1-30 kDa	9,77	14,93	10,84
10,1-20 kDa	12,08	17,19	5,63
5,1-10 kDa	13,70	16,68	6,17
2,1-5 kDa	23,01	18,43	15,15
1,1-2 kDa	9,00	9,13	22,40
< 1 kDa	9,28	7,62	14,40

5.2.2 Dietas experimentais

Os tipos de dietas produzidas foram: dieta controle (dieta sem a inclusão de hidrolisado); dieta HP (contendo hidrolisado produzido com a enzima Protamex®); dieta HS (contendo hidrolisado produzido com a enzima pepsina suína) e dieta HE (contendo hidrolisado produzido com enzima endógena – autólise).

As dietas eram isoproteicas e isoenergéticas, formuladas de acordo com as exigências nutricionais da truta arco-íris (HARDY, 2002; NRC, 2011). Os hidrolisados substituíram 8% da quantidade total de proteína bruta das dietas experimentais, resultando em 22% de inclusão de hidrolisado na dieta HP, 26% de inclusão na dieta HS e 23,2% de inclusão na dieta HE. Além do hidrolisado as dietas foram formuladas utilizando farinha de peixe, farelo de soja e isolado proteico de soja como fontes proteicas e, o óleo de peixe como fonte energética.

As rações foram produzidas no Laboratório de Piscicultura, CAV/UEDESC. Foi realizada a trituração dos ingredientes em moinho de faca com peneira de 2 mm de diâmetro de malha. Posteriormente, os ingredientes foram misturados (de acordo com a formulação) e ocorreu a peletização, com os grânulos secos em estufa a 45°C por 24 horas. As rações foram armazenadas em potes plásticos e conservadas em geladeira durante todo o experimento. As análises bromatológicas dos ingredientes e das dietas experimentais foram realizadas de acordo com Horwitz (2000).

Tabela 4 - Composição das dietas experimentais

<i>Dieta / Tipo de enzima¹</i>	Controle	HP	HS	HE
<i>Ingredientes (%)</i>				
Farelo de soja	14,0	14,0	14,0	14,0
Farinha de peixe	45,0	30,5	30,0	29,8
Proteína isolada de soja	24,0	24,0	24,0	24,0
Óleo de peixe	16,0	8,5	5,0	8,0
Vitaminas e Minerais ²	1,0	1,0	1,0	1,0
Hidrolisado Protamex	0,0	22,0	0,0	0,0
Hidrolisado Pepsina	0,0	0,0	26,0	0,0
Hidrolisado Endógena	0,0	0,0	0,0	23,2
<i>Composição (calculada)</i>				
Matéria seca (%)	93,68	94,62	94,64	94,66
Proteína bruta (%)	45,37	45,54	45,27	45,17
Extrato etéreo (%)	23,81	26,01	25,40	25,26
Matéria mineral (%)	11,12	10,14	10,09	9,98
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	5194,86	5293,74	5225,43	5254,67

¹HP: dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS: dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE: dieta contendo hidrolisado produzido com enzima endógena – autólise.

²Enriquecimento por quilograma de ração: Vit. A (3.000 UI); Vit. D3 (3.000 UI); Vit. E (200,00 mg); Vit. B1 (6,00 mg); Vit. B2 (8,00 mg); Vit. B6 (3,00 mg); Vit. B12 (20,00 mg); Vit. C (350,00 mg); Vit. K (6,00 mg); Ac. Fólico (1,00 mg); Ac. Pantotênico (20,00 mg); Biotina (0,10 mg); Cobre (10,00 mg); Ferro (100,00 mg); Iodo (5,00 mg); Manganês (70,00 mg); Niacina (100,00 mg); Zinco (150,00 mg); (150,00 mg); B.H.T. (125,00 mg); Colina (150,00 mg).

Tabela 5 - Composição calculada dos aminoácidos (% de PB da dieta) das dietas experimentais. Requisitos de aminoácidos da truta arco-íris (HARDY, 2002)*.

Aminoácidos (%)	Controle	HP	HS	HE	Exigência*
Arginina	2,93	2,97	2,87	2,63	2,25
Histidina	1,29	1,18	1,17	1,12	0,81
Isoleucina	2,66	2,41	2,35	2,42	0,90
Leucina	4,01	3,76	3,66	3,78	1,57
Lisina	3,88	3,35	3,39	3,44	2,02
Met+Cis	1,80	1,70	1,64	1,69	1,57
Fen+Tir	3,85	3,64	3,54	3,62	2,02
Treonina	2,12	2,01	1,95	1,97	0,90
Triptofano	0,55	0,63	0,64	0,68	0,22
Valina	2,84	2,67	2,59	2,67	1,44

HP: dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS: dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE: dieta contendo hidrolisado produzido com enzima endógena – autólise.

5.2.3 Manejo da unidade experimental

Diariamente foi realizado o monitoramento da temperatura ($20,7 \pm 1,3^\circ\text{C}$) e concentração de oxigênio dissolvido ($4,4 \pm 0,5\text{mg/L}$). Semanalmente foi aferido a concentração de amônia total ($0,6 \pm 0,06\text{mg NH}_3/\text{L}$) e potencial hidrogeniônico ($7,6 \pm 0,1$) da água das caixas, com auxílio de equipamentos eletrônicos (YSI PROPLUS, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) e testes laboratoriais. A cada dois ou três dias, a matéria orgânica depositada no fundo das caixas foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha.

5.2.4 Parâmetros produtivos

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (8hs e 18hs) até saciedade aparente. As trutas foram pesadas no início do estudo e após 56 dias de experimento. Os seguintes parâmetros de desempenho foram avaliados: ganho de peso (GP = diferença entre peso final e peso inicial), taxa de crescimento específico (TCE = $(\text{Ln}(\text{peso final}) - \text{Ln}(\text{peso inicial}))/n \times 100$), consumo individual aparente de ração (CR = alimento consumido no período), conversão alimentar aparente (CA = consumo de ração/ ganho de peso) e taxa de eficiência proteica (TEP = $100 \times (\text{ganho de peso absoluto} / \text{proteína bruta consumida})$).

5.2.5 Coleta de material biológico

Para a coleta de material biológico foram utilizados seis peixes de cada caixa após 56 dias de experimento. Os peixes permaneceram em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato digestório. Os animais foram insensibilizados com eugenol (10 mg/L) e foram eutanasiados.

Foi coletado sangue por punção caudal e posteriormente estes peixes foram laparotomizados para retirada e pesagem da gordura visceral, do fígado, retirada de um fragmento do músculo esquelético da região caudal e retirada do intestino. O material biológico foi acondicionado em criotubo, devidamente identificado e congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C . Um animal por caixa foi destinado à análise da composição corporal (congelados imediatamente em freezer comum após a eutanásia).

5.2.6 Análise sanguínea

Após a coleta de sangue, algumas alíquotas foram destinadas para separação do soro e outras para separação do plasma, de acordo com a análise a que se delibera. A separação das frações do sangue foi realizada pela centrifugação do sangue em mini centrífuga para microtubos logo após a coleta, para separação do plasma, e após uma hora à temperatura ambiente, para separação do soro. O plasma e o soro foram congelados para realização das análises futuras.

Os metabolitos analisados no sangue foram: glicose plasmática (Método GOD-Trinder, kit comercial), colesterol (Método Enzimático-colorimétrico, kit comercial), triglicerídeos (Método Enzimático-Trinder, kit comercial), proteínas totais (Método do Biureto, REINHOLD, 1953) e albumina (Método colorimétrico/verde de bromocresol, Kit Labtest).

A partir das amostras sanguíneas heparinizadas, procedeu-se a determinação do hematócrito pela técnica do microhematócrito (GOLDENFARB et al., 1971), dosagem da taxa de hemoglobina (Kit Labtest) e contagem total de eritrócitos. A partir dos dados obtidos, foram calculados os índices hematimétricos, compreendidos pelo volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM). A realização da contagem do número de eritrócitos foi realizada com alíquotas de sangue diluídas 1:200 em solução de formol-citrato 4% (NATT; HERRICK, 1952). Após a homogeneização da solução a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

5.2.7 Reservas energéticas teciduais

Foram avaliadas as relações somáticas: índice gorduro-viscerossomático (IGVS) e índice hepatossomático (IHS) de acordo com a fórmula: $[100 \times (\text{peso do tecido} / \text{peso vivo})]$. Nos fragmentos de fígado e tecido muscular foram realizadas as análises para determinação do lipídio total hepático e muscular (BLIGH;DYER, 1959) e do glicogênio hepático (MOON et al., 1989).

5.2.8 Metabolismo hepático

O fígado foi descongelado, fracionado em amostras de 50mg e homogeneizado em tampão fosfato. A determinação da atividade hepática das enzimas glicoquinase (GK), hexoquinase (HK), piruvatoquinase (PK), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), frutose-1,6 bifosfatase (FBPase), alanina amino transferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); foram realizadas de acordo com os protocolos modificados e descritos por Pérez-Jiménez et al. (2007). A atividade específica das enzimas foi expressa em unidades de proteína do tecido utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (CAIN ; SKILLETER, 1987).

5.2.9 Enzima digestiva – protease alcalina total

A análise da atividade das proteases totais do trato gastrointestinal foi realizada com um peixe de cada unidade experimental (n=5 peixes por tratamento). O trato digestivo foi extraído, pesado (g) e homogeneizado em água gelada (v) (1:6, w/v) usando um homogeneizador Van Potter (cinco vezes de 30 segundos em banho de gelo) e centrifugado a $27.167 \times g$ (Eppendorf, modelo 5804 R) por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar a atividade das enzimas digestivas. A atividade da protease alcalina total foi determinada pela hidrólise da azocaseína (Sigma, St. Louis, MO, EUA), utilizando o método descrito por Garcia-Carreño et al. (1997). A concentração proteica solúvel do sobrenadante foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão.

5.2.10 Análise estatística

Antes de todas as análises estatísticas foi verificada a normalidade e homocedasticidade. Posteriormente foi realizado a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) ou Duncan (5%) através do programa estatístico SAS versão 9.0.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Desempenho

As dietas controle, HP e HS proporcionaram os melhores resultados ($P < 0,05$) de ganho de peso e taxa de crescimento específico (Tabela 6). A dieta controle foi mais consumida ($P < 0,05$) pelas trutas, seguida pelas dietas HP e HS. A menor ingestão foi dos animais alimentados com a dieta HE. As dietas controle, HP e HS resultaram em uma maior ($P < 0,05$) conversão alimentar e taxa de eficiência proteica dos peixes. A dieta HE diminuiu ($P < 0,05$) a sobrevivência em relação às dietas controle, HP e HS.

Tabela 6 - Médias dos parâmetros de desempenho produtivo de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.

	Controle	HP	HS	HE	CV
GP	19,76±2,04A	20,24±1,75 ^a	18,62±1,60A	15,49±1,28B	9,13
TCE	6,53±0,32A	6,60±0,26 ^a	6,35±0,25A	5,82±0,23B	4,26
CAT	449,7±13,7A	416,2±23,6B	404,5±15,5B	369,7±13,9C	4,19
CA	1,52±0,11A	1,39±0,08 ^a	1,58±0,14AB	1,76±0,12B	7,57
TEP	145,0±10,8A	157,9±9,0A	140,3 ± 12,2AB	126,0± 8,5B	7,23
SOB	100,0±0,0A	100,0± 0,0A	98,6±0,4A	92,0±0,8B	3,23

Valores são médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

TCE = taxa de crescimento específico; CAT = consumo alimentar total (g); CA = conversão alimentar; TEP = taxa de eficiência proteica (ganho de peso (g) por quantidade de proteína ingerida (g)), SOB = sobrevivência (%), HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha.

5.3.2 Parâmetros sanguíneos

Nos parâmetros sanguíneos foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) apenas na hemoglobina, colesterol e glicose plasmática (Tabela 7 e 8). A hemoglobina dos animais não diferiu ($P > 0,05$) em nenhum tratamento em relação ao controle. A glicose plasmática do controle foi superior ($P < 0,05$) ao do grupo HE. O colesterol aumentou ($P < 0,05$) no tratamento HS em relação ao tratamento controle. No tratamento HE houve diminuição ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Tabela 7 – Hematologia de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.

	Controle	HP	HS	HE	CV
HTC ^{n.s}	46,33±10,16	42,69±9,43	40,90±4,20	36,28±8,15	20,19
HGB	7,61±0,68AB	7,96±0,97A	7,74±0,60AB	6,96±1,27B	12,13
NE ^{n.s}	227,50±46,98	263,93±86,33	288,33±119,90	210,27±98,44	36,41
VCM ^{n.s}	220,57±45,28	192,14±82,27	188,12±71,24	179,75±102,95	34,87
TDH ^{n.s}	2,27±0,46	2,63±0,86	2,88±1,19	2,10±0,98	36,41
CHCM ^{n.s}	17,75±3,84	19,42±3,70	18,21±1,87	17,42±3,81	18,62
HCM ^{n.s}	34,92±8,69	33,62±11,99	32,24±13,21	39,88±18,42	37,83

Valores são médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha; HTC = hematocrito; HGB = hemoglobina; NE = número de eritrócitos; VCM = volume corpuscular médio; TDH = total de hemácias.

Tabela 8 – Bioquímica sanguínea de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.

	Controle	HP	HS	HE	CV
GLI	55,12±8,74A	46,50±4,85AB	44,90±14,50AB	41,45±9,21B	21,84
PPT ^{n.s}	6,63 ± 0,91	6,66 ± 1,16	6,42 ± 0,64	5,64 ± 1,85	17,83
ALB ^{n.s}	2,05±0,57	2,43±0,52	2,43±0,57	2,57±0,40	22,35
TRI ^{n.s}	304,50±112,65	186,00±40,03	371,80±111,30	276,20±146,48	39,2
COL	398,40±59,09BC	449,20±77,15AB	514,50±92,51A	282,20±26,28C	16,99

Valores são médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha; GLI = glicose plasmática (mg/dL); PPT = proteína plasmática; ALB = albumina (g/dL); TRI = triglicerídeos totais (mg/dL); COL = colesterol (mg/dL).

5.3.3 Reservas energéticas teciduais

Os resultados das reservas energéticas teciduais estão apresentados na tabela 9. O lipídio muscular do grupo HE e HS foram menores ($P<0,05$) em relação ao tratamento controle e HP.

Tabela 9 – Reservas energéticas teciduais de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.

	Controle	HP	HS	HE	CV
IHS ^{n.s}	1,42±0,24	1,45±0,27	1,21±0,19	1,24±0,24	18,16
IGVS ^{n.s}	4,13±1,31	4,41±0,44	3,89±0,67	2,93±1,03	24,17
Lip Hep ^{n.s}	2,94±2,28	6,46±2,43	3,86±0,84	2,96±1,47	44,21
Lip Mus ^{n.s}	22,89±1,41 ^a	23,02±1,70A	12,19±8,47B	8,24±5,49B	30,16
Glicogênio ^{n.s}	2,36±0,55	2,75±0,73	2,11±0,61	2,14±0,52	26,24

^{n.s} Não significativo após ANOVA. Valores são médias ± desvio padrão.

HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha; IES = Índice estomagossomático; IHS = Índice hepatossomático; IGVS = Índice gorduro-
viscerossomático; Lip Hep = Lipídeo hepático; Lip Mus = Lipídeo muscular.

5.3.4 Enzimas metabólicas

A enzima AST foi superior no controle em comparação com os demais tratamentos ($P<0,05$). A atividade da AST no grupo HP foi menor ($P<0,05$) em relação ao tratamento HE. Não ocorreu diferença entre os tratamentos HS e HE ($P>0,05$) (Tabela 10). Não ocorreram diferenças entre os tratamentos nas demais enzimas analisadas do metabolismo dos peixes ($P<0,05$).

Tabela 10 – Atividade das enzimas metabólicas de juvenis de truta arco-íris alimentados com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha.

	Controle	HP	HS	HE	CV
<i>Glicólise ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)</i>					
HK^{n.s}	2,78 \pm 0,89	2,63 \pm 0,84	2,95 \pm 1,25	2,70 \pm 0,82	34,76
GK^{n.s}	3,45 \pm 1,62	3,12 \pm 0,77	2,28 \pm 0,95	3,07 \pm 1,24	40,25
PK^{n.s}	3,59 \pm 1,20	4,67 \pm 1,26	3,89 \pm 0,51	5,17 \pm 1,74	30,07
<i>Gliconeogênese ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)</i>					
FBPase^{n.s}	6,22 \pm 1,75	6,63 \pm 2,31	5,67 \pm 1,89	6,44 \pm 1,93	31,72
<i>Transaminação/desaminação ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)</i>					
AST	6,72 \pm 0,47A	2,53 \pm 1,01C	3,71 \pm 0,40BC	4,43 \pm 0,31B	14,10
ALT^{n.s}	2,50 \pm 0,78	3,41 \pm 0,91	2,94 \pm 0,92	2,00 \pm 0,79	31,00
<i>Via das pentoses (Lipogênese) ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína)</i>					
G6PDH^{n.s}	12,19 \pm 4,87	14,15 \pm 3,62	11,26 \pm 6,06	8,37 \pm 4,19	41,91

Valores são média em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P>0,05$). HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha; HK=Hexoquinase; GK=Glicoquinase; PK=Piruvatoquinase; FBPase=Frutose-1,6 bifosfatase; AST= Aspartato Aminotransferase; ALT = Alanina Aminotransferase. ; G6PDH=Glicose-6- fosfato desidrogenase.

5.3.5 Proteases alcalinas totais

A atividade das proteases alcalinas totais dos grupos HP e HS foram maiores ($P<0,05$) do que as do controle e do HE (Figura 1).

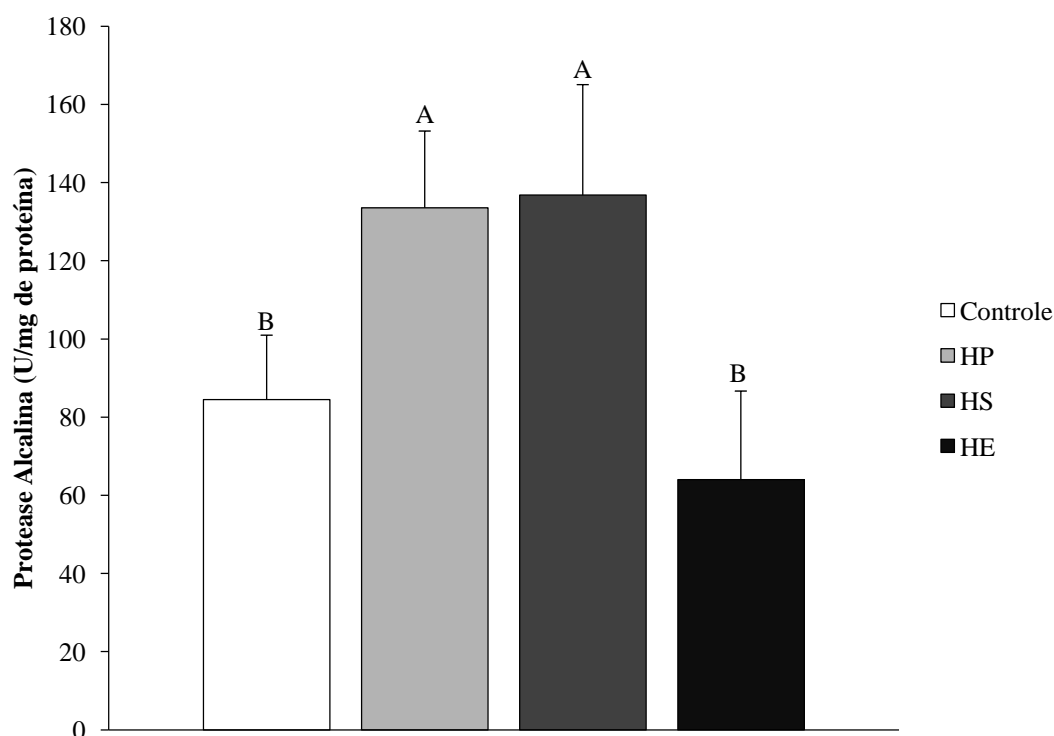


Figura 1 Atividade das proteases alcalinas totais do trato digestório de juvenis de truta arco-íris alimentadas com dietas contendo diferentes hidrolisados proteicos de víscera de sardinha. Valores são médias \pm desvio padrão. Médias diferem entre si pelo teste de Duncan ($P > 0,05$). HP = dieta contendo hidrolisado produzido com enzima Protamex; HS = dieta contendo hidrolisado produzido com pepsina suína; HE = dieta contendo hidrolisado produzido com enzimas endógenas da sardinha.

5.4 DISCUSSÃO

O tipo de enzima utilizada na produção do hidrolisado interferiu nas características do hidrolisado que conseqüentemente influenciou no crescimento dos animais. De modo evidente é observado que os tipos de hidrolisados variaram no GH, perfil de peptídeos e quantidades de aminoácidos livres (GONÇALVES et al, 2019 – Capítulo 3). A influencia das enzimas na qualidade nutricional e química dos hidrolisados já foram comprovadas e relatadas (MARTINS, VIEIRA e PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; CHAROENPHUN et al., 2013; BAEZ-SUAREZ et al., 2016). Os animais que consumiram as dietas contendo hidrolisado Protamex e pepsina tiveram um ganho de peso igual ao do grupo controle contendo farinha de peixe. A utilização de hidrolisado de resíduo de atum na alimentação de truta arco-íris, com até 37,5% de inclusão, também não diferiu do ganho de peso de animais que consumiram a dieta controle (BAE et al., 2019). Apesar de a matéria-prima ser a mesma, o hidrolisado produzido com enzimas endógenas prejudicou o desempenho dos animais. As dietas utilizadas em todos os tratamentos possuem composição química e perfil de

aminoácidos de acordo com as exigências estabelecidas para a espécie (HARDY, 2002). Desta forma se evidencia que o menor crescimento dos animais que se alimentavam da dieta contendo hidrolisado de enzimas endógenas, foi devido ao baixo consumo de ração. Diminuições no crescimento e consumo também foram encontradas para tilápias alimentadas com 20% de autolisado de camarão (PLASCENCIA-JATOMEA et al., 2002).

A falta de palatabilidade das dietas contendo hidrolisados pode ser observada pela diminuição do consumo em todos os tratamentos. O hidrolisado com enzima endógena foi o menos palatável e com menor GH. Os hidrolisados com maiores GHs são mais atrativos devido a maior proporção de proteínas solúveis de baixo peso molecular (HALVER e HARDY, 2002). Estas informações foram comprovadas para hidrolisados de carcaça de sardinha (*Sardinella* spp.), em que hidrolisados com GH de 22,2% foi mais atrativo do que hidrolisados com GH de 5,9% durante a alimentação de jundiá (*Rhamdia quelen*) (BROGGI et al., 2017). Também com jundiá e utilizando GHs semelhantes ao do presente estudo, foi observado que o consumo de dietas contendo hidrolisado de sardinha (*Sardinella* spp.) com um GH de 20,1% foi superior ao consumo de dietas contendo hidrolisado com GH de 9,97% (WOSNIAK et al., 2016). Esta pode ser uma das explicações entre as diferenças de consumos dos tratamentos desta pesquisa.

Os aminoácidos livres e os peptídeos hidrofóbicos também estão relacionados a baixa palatabilidade (KRISTINSSON, 2006). Os hidrolisados utilizados possuíam as frações solúveis, insolúveis e emulsão. É possível observar grandes quantidades de pequenos peptídeos nas frações insolúveis e emulsão. Os peptídeos destas frações possuem características hidrofóbicas (LIASET; ESPE, 2008). Trutas arco-íris alimentadas com hidrolisados ultra-filtrados, onde foram reduzidos os pequenos peptídeos solúveis, reduziram o consumo de ração em comparação com a farinha de peixe (AKNES et al., 2006). A presença em grandes quantidades de alguns tipos de aminoácidos no hidrolisado, como a valina, isoleucina, fenilalanina, leucina, tirosina e triptofano, diminuem a palatabilidade (PEDERSEN, 1994). Todos estes aminoácidos estão presentes na composição dos hidrolisados, porém os perfis são semelhantes há desequilíbrio. Os desequilíbrios entre os aminoácidos das dietas já foram relatados como fator de diminuição da palatabilidade (WOSNIAK et al., 2016). A piora da palatabilidade também já foi descrita e comprovada por maiores níveis de triptofano em hidrolisado de pescado (NILSANG et al., 2005). Entretanto, no presente estudo os

níveis de triptofano não são elevados e não há grandes diferenças entre os hidrolisados. A provável influência na atratividade e sabor dos hidrolisados esta relacionada às quantidades de aminoácidos livres. Os hidrolisados produzidos com enzimas endógenas possuem maiores quantidades de aminoácidos livres hidrofóbicos. Estes aminoácidos hidrofóbicos, em especial os de cadeia ramificada (isoleucina, valina e leucina), já foram descritos por conceber sabor amargo prejudicando a utilização prática do hidrolisado (BOUGATEF et al., 2008). Durante o manejo alimentar, os aminoácidos solúveis podem ser diluídos na água de cultivo (GUZMÁN; VIANA, 1998), deixando os aminoácidos hidrofóbicos mais evidentes e destacando o sabor amargo (HALL ; AHMAD, 1992).

O metabolismo energético e a via das pentoses não sofreu interferência das dietas. As enzimas hepáticas do metabolismo intermediário podem ser influenciadas pela diminuição da alimentação (PEREZ-JIMENEZ et al., 2007). Esta influencia foi encontrada no presente experimento apenas na enzima AST, com diminuição na quantidade de enzimas para os tratamentos que consumiram hidrolisados. Ao contrario do que foi encontrado neste estudo, douradas alimentadas com dietas pouco palatáveis também diminuíram o consumo de ração, entretanto as quantidades de AST hepática não foram influenciadas (GOMEZ-REQUENI et al., 2004). A privação de alimentos para robalo europeu também não influenciou na quantidade de AST hepática (PEREZ-JIMENEZ et al., 2007). Desta forma, a alteração da AST pode não ter sido influenciada apenas pelo consumo.

Outra explicação pode estar relacionada à absorção e o perfil de aminoácidos e peptídeos dos hidrolisados. A AST esta relacionada ao metabolismo de aminoácidos em processos de desaminação e transaminação (METON et al., 1999). Percebe-se que não ocorreu desaminação e catabolismo de aminoácidos no grupo controle porque não foi encontrado interferência na via da gliconeogênese e via da glicólise. O tratamento controle consumiu as proteínas de forma intacta na dieta. Estes peixes podem ter realizado síntese de aminoácidos não-essenciais para incremento proteico (CHENG et al., 2010). Entretanto, os animais que consumiram dietas com hidrolisado produzido com enzima Protamex e pepsina diminuíram a sua síntese. Como já citado, estes animais tiveram crescimento satisfatório apesar de diminuição do consumo. Isto pode ser devido a maior biodisponibilidade da proteína dos hidrolisados, principalmente com di e tri-peptídeos (GANAPATHY et al., 1994). O processo de absorção é facilitado, com maiores quantidades do que as proteínas intactas, devido ao co-transportador PEPT 1 e 2 no

intestino dos animais (DANIEL, 2004). A influência do hidrolisado no co-transportadores PEPT 1 e 2 foram comprovadas para bacalhau do atlântico (*Gadus morhua*) através de expressão gênica (BAKKE et al., 2010). Os animais que consumiram a dieta contendo hidrolisados com enzimas endógenas consumiram menos ração e estas dietas tinham quantidades superiores de aminoácidos livres e peptídeos de pequeno peso molecular. O excesso destas quantidades de pequenos peptídeos e aminoácidos pode prejudicar a absorção (ESPE et al., 1993) devido a saturação dos mecanismos de transporte do intestino (TONHEIM et al., 2005). Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentados com 30% de silagem de arenque (*Clupea harengus*) tiveram a absorção de nutrientes prejudicada devido ao excesso de peptídeos de baixo peso molecular (ESPE et al., 1999). Desta forma sugere-se que os animais que consumiram dietas contendo hidrolisados de enzimas endógenas tiveram a via de síntese de aminoácidos mais ativa do que os animais que consumiram hidrolisado Protamex e pepsina. Futuros estudos sem a influencia do consumo dos animais precisam ser realizados para se chegar a conclusões mais concretas. O metabolismo proteico dos animais que consumiram hidrolisados necessitam ser melhor investigados.

Ocorreu influência nas reservas energéticas, diminuindo a quantidade do lipídeo muscular dos peixes que se alimentaram de dietas contendo hidrolisado produzido com pepsina. Devido aos problemas de palatabilidade já relatados, esta característica demonstra que os animais estavam utilizando as reservas para manutenção e desenvolvimento. Esta característica poderia ocasionar em queda de desempenho produtivo em longo prazo. A hidrolise pela pepsina também pode influenciar no valor nutricional e diminuir a funcionalidade do hidrolisado (KRISTINSSON ; RASCO, 2000) devido a acidificação durante o processo de hidrolise (SGARBIERI, 1996). As trutas que consumiram dietas contendo hidrolisado com enzimas endógenas resultaram em diminuição do lipídeo muscular, glicose plasmática, colesterol e níveis de hemoglobina. Estas características podem indicar utilização das reservas endógenas devido à deficiência nutricional (PERES, SANTOS; OLIVA-TELES, 2014).

Os parâmetros sanguíneos, de maneira geral, não foram afetados pelos tratamentos. Truta arco-íris alimentadas com até 37,5% de hidrolisado de subproduto de atum (BAE et al., 2019) e pirarucu (*Arapaima gigas*) alimentados com até 20% de hidrolisado de resíduo de tilápia (RIBEIRO et al., 2017), também não sofreram alterações nos parâmetros hemato-bioquímicos. A privação de alimentos pode alterar os níveis dos metabólicos plasmáticos dos peixes (FIGUEIREDO-GARUTTI et al., 2002).

Apesar de não estar ocorrendo privação de alimento propriamente dita, os animais que tiveram redução no consumo podem estar apresentando indícios destas alterações fisiológicas. Ocorreu uma diminuição da glicose em todos os tratamentos que consumiram hidrolisados em comparação com o grupo controle. Este resultado se assemelha a diminuição da glicose plasmática de robalos europeus (*Dicentrarchus labrax*) e trutas arco-íris com inanição (CONGLETON; WAGNER, 2006; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2007; PERES, SANTOS ; OLIVA-TELES, 2014). Apesar da diminuição da glicose plasmática, a via glicolítica e o nível de glicogênio não foram influenciados. A hemoglobina (HGM) esta dentro dos valores estabelecidos para a truta arco-íris (SVOBODOVA, PRAVDA ; PALACKOVA, 1991). Variações mais agudas são necessárias para diagnosticar problemas de saúde nos animais (CHAROO, CHALKOO; QURESHI, 2014).

A variação do nível de colesterol entre os tratamentos pode estar relacionado ao menor consumo das rações contendo hidrolisado. Pesquisas indicam que a quantidade de colesterol plasmático esta diretamente ligada a saúde e imunidade dos peixes. Animais com menor quantidade de colesterol plasmático podem estar enfermos (FUKUDA et al., 1997; AYDIN, GÜLTEPE ; YILDIZ, 2000) ou sobre algum tipo de estresse (CHANG et al., 2006; CUI, ZHOU ; LI, 2010). Peixes em condições de baixa alimentação, também possuem colesterol plasmático baixo (KROGDAHL et al., 1999; STEPANOWSKA, NEDZAREK; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 2006; LONG et al., 2008). De acordo com o descrito, os níveis de colesterol baixos do tratamento que consumiu hidrolisado produzido com enzimas endógenas podem estar relacionados ao menor consumo, como mencionado anteriormente. Esta característica em longo prazo poderia comprometer a saúde dos animais. A privação de alimentos resultou em diminuição do colesterol em robalos europeus (PEREZ-JIMENEZ et al., 2007; PERES, SANTOS e OLIVA-TELE, 2014) e trutas arco-íris (CONGLETON; WAGNER, 2006). Douradas (*Sparus aurata*) com baixo consumo de alimento, devido a baixa palatabilidade de dietas com proteínas vegetais, também tiveram reduções nos níveis de colesterol (GÓMEZ-REQUENI et al., 2004).

Ocorreu aumento da atividade das proteases alcalinas totais dos tratamentos que consumiram hidrolisado produzido com Protamex e hidrolisado produzido com pepsina suína. O hidrolisado proteico de pescado pode aumentar a atividade da protease alcalina (HA et al., 2019). A influencia é sugerida como um efeito prebiótico no organismo, pois o hidrolisado pode servir como meio de desenvolvimento para o crescimento

microbiano (HORN et al., 2005; KOTZAMANIS et al., 2007). Estudos descrevendo peptídeos prebióticos já foram demonstrados (ARIHARA, 2006). O crescimento de bactérias lácticas em níveis superiores aos meios comerciais MRS também foram relatados em hidrolisados (SAFARI et al., 2012). O desenvolvimento de bactérias lácticas foi testado em meios de cultivo contendo hidrolisado de vísceras de sardinha produzido com enzima Protamex, pepsina e endogena (GONÇALVES et al., 2019 Capítulo 1). Nas circunstâncias testadas foi diagnosticada inibição para o crescimento das bactérias. Entretanto o nível de inibição foi diferente entre os hidrolisados, sendo que o crescimento das bactérias lácticas foi menos inibido nos meios de cultura com hidrolisados produzidos com Protamex e pepsina. O aumento da atividade enzimática digestiva em peixes alimentados com prebióticos e probióticos já foram investigados (GHOSH et al., 2008 ; SUZER et al., 2008 ; WANG, 2011). O efeito prebiótico e o aumento de proteases alcalinas totais foram encontrados em jundiás alimentados com até 5% de hidrolisado proteico de músculo de sardinha (HA et al. 2019). O hidrolisado de subproduto de sardinha (*Sardinella aurita*) também foi descrito com propriedades microbiológicas (SOUISSI et al 2018).

Devido os problemas de palatabilidade encontrados para truta arco-íris, futuros estudos utilizando técnicas de extração do amargor são necessários. Principalmente para a utilização da dieta contendo hidrolisado produzido com enzima endógena. Os hidrolisados produzidos com Protamex e com pepsina suína demonstraram potencial para utilização em trutas arco-íris. Estes hidrolisados não influenciaram negativamente na fisiologia dos animais e melhoraram a digestão proteica.

5.5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os hidrolisados proteicos de vísceras de sardinha são pouco palatáveis para trutas arco-íris. O tipo de enzima utilizada para produzir os hidrolisados influenciou no desempenho produtivo, reservas enérgicas e atividade de proteases digestivas de trutas arco-íris.

O hidrolisado produzidos com Protamex possui baixa palatabilidade para trutas arco-íris, mas não prejudica o desempenho dos juvenis. A alimentação com esse hidrolisado indica efeito positivo na digestão proteica.

O hidrolisado produzido com enzima pepsina suína é similar ao hidrolisado produzido com enzima Protamex, porém ele compromete as reservas energéticas do

animal. Em períodos mais longos de alimentação poderia comprometer o ganho de peso dos animais.

O hidrolisado produzidos com enzimas endógenas de sardinha são pouco palatáveis, mesmo em relação aos outros hidrolisados. Este hidrolisado prejudica o crescimento e a fisiologia de juvenis de trutas arco-íris.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, P.; MEDALE, F.; KAUSHIK, S. J. Influence de la nature des glucides alimentaires sur l'utilisation de 2 sources protéiques par la truite Arc-en-ciel élevée à 8° ou 18°C. **Reprod Nutr Dev**, v. 35, p.129-136, 1995.

AKSNES, A.; HOPE, B.; JÖNSSON, E.; BJÖRNSSON, B. T.; ALBREKTSSEN, S.; Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. **Aquaculture**, v. 261, p.305-317, 2006

AMORIM, R. G. O.; DESCHAMPS, F. C.; PESSATTI, M. L. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 967-974, 2016

ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science** **74**, p. 219-229, 2006

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v.40, n. 5, p. 1957-1966, 2005

AYDIN S.; GÜLTEPE N.; YILDIZ H. Natural and experimental infections of *Campylobacter cryaerophila* in rainbow trout: Gross pathology, bacteriology, clinical pathology and chemotherapy. **Fish Path**, v. 35, n.3, p.117-123, 2000.

BAEZ-SUAREZ, Andrea J.; OSPINA-DE-BARRENECHE, Nelly ; ZAPATA-MONTOYA, José E. Efecto de Temperatura, pH, Concentración de Sustrato y Tipo de Enzima en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*) **Información Tecnológica**, v. 27 , n.6, p. 63-76, 2016.

BAKKE, S.; JORDAL, A. E. O.; GOMEZ-REQUENI, P.; VERRI, T.; KOUSOULAKI, K.; AKSNES, A.; RØNNESTAD, I. Dietary protein hydrolysates and free amino acids affects the spatial expression. Of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of atlantic cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Phys., Part B** , v. 156, p.48-55, 2010

BERTHELOT C; BRUNET F; CHALOPIN D; JUANCHICH A; GUIGUENK Y.; BERNARD, M; NOEL B. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. **Nat Commun**, v.5, n.3657, 2014.

BOUGATEF A.; NEDJAR-ARROUME N.; RAVALLEC-PLÉ R.,.; LEROY Y.; GUILLOCHON D.; BARKIA A.; NASRI M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food chemistry**, v.111, n.2, p.350-6, 2008

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911-7 1959.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** V.72, p.248,1976

BROGGI, J. A.; WOSNIAK, B.; UCZAY, J.,;PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Hidrolisado proteico de resíduo de sardinha como atrativo alimentar para juvenis de jundiá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v.2017, p.505-512, 1964.

BUI, H.T.D.; KHOSRAVI, S.; FOURNIER, V., HERAULT; M.; LEE, K.J. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. **Aquaculture**. p. 11-16, 2014.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Ed). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p. 217-254, 1987.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3020-3038, 2012

CHANG YM, CAO DC, SUN XW, LIANG LQ. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. **Chin J Fish**, v.19, n.2, p. 71-75, 2006

CHENG, Z.; Ai, Q.; MAI, K.;XU, W.;MA, H.; Li, Y.; ZHANG, J. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 305, p. 102–108, 2010.

CHAROO, S. Q; CHALKOO, S. R; QURESHI, T. A. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood profile alterations. **e-Journal of Science & Technology**, v. 9, n. 2, p. 29-35, 2014.

CHAROENPHUN N.; CHEIRSILP B.; SIRINUPONG N.; YOURAVONG W. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **European Food Research and Technology**, v. 236, n.1 p. 57-63,2013.

CHOTIKACHINDA, R.; TANTIKITTI, C.; BENJAKUL, S; RUSTAD, T. Tuna viscera hydrolysate products prepared by different enzyme preparations improve the feed intake and growth of Asian seabass, *Lates calcarifer*, fed total fishmeal replacement diets. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 40, n. 1, 2018.

CONGLETON, J.L; WAGNER, T. Blood-chemistry indicators of nutritional status in juvenile salmonids. **Journal of fish biology**, v.69, n. 2, p.473-90, 2006

COSTA-BOMFIM, C. N.; SILVA, V. A.; BEZERRA, R. DE S.; DRUZIAN, J. I.; CAVALLI, R. O. Growth, feed efficiency and body composition of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) fed increasing dietary levels of shrimp protein hydrolysate. **Aquaculture Research**, p.1-8, 2016.

CUI, X.S.; ZHOU, C.W.; LI, Z.Q. Effects of starvation and high temperature stress on serum biochemical parameters of *Schizothorax prenanti*. **Feed Res**, v. 2, p.63-5, 2010.

DANIEL, H. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. **Annual Review of Physiology**, v.66, n. 1, p.361-384, 2014.

DERAZ SF, EL-FAWAL GF, ABD-ELLATIF SA, KHALIL AA. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* fish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n.2, p.171-5, 2011.

DONG, F.M.; HARDY, R.W.; HAARD, N.F.; BARROWS, F.T.; RASCO, B.A.;FAIRGRIEVE, W.T.; Forster, I.P. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. **Aquaculture**, v.116, n.2-3, p.149-158, 1993.

ESPE, M., SVEIER, H., HØGØY, I., LIED, E. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. **Aquaculture**, v. 174, p.119-137, 1999.

ESPE, M.; LIED, E.; TORRISSEN, K. R. Changes in plasma and muscle free amino acids in atlantic salmon (*Salmo salar*) during absorption of diets containing different

amounts of hydrolysed cod muscle protein. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.105, n.3, p. 555-562, p.1993

EZEJIOFOR, T.I.N.; ENEBAKU, U. E.; OGUEKE, C. Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review. **British Biotechnology Journal**, v.4, n. 4, p.418-481, 2014.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M. L., NAVARRO, L.; CAPELA, E.; SOUZA, R. H.; MORAES, G.; GUTIERREZ, J.; VICENTINO-PAULINO, M.L.; . Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 132, n.2, p. 467-476, 2002

FUKUDA, Y; MAITA, M; SATOH, K; OKAMOTO, N .Influence of dissolved oxygen concentration during pre and post infection on the mortality induced by artificial infection with *Enterococcus seriolicida* in yellow tail. **Fish Pathol**, v. 32 p. 129–130, 1997.

GANAPATHY V.; BRANDSCH M.; LEIBACH F.H; JOHNSON L.R. **Physiology of the Gastro-Intestinal Tract**, 3.ed. Raven Press, New York, 1994, 1773-1794p.

GARCIA-CARREÑO, F.L., NAVARRETE DEL TORO, M.A., EZQUERRA, J.M., Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. Effect of protease inhibition in protein ingredients. **J. Mar. Biotechnol**, v. 5, p. 36-40, 1997.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. **Aquacult. Nutr.**, v. 14,p. 289-299, 2008.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E., et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.

GOMEZ-REQUENI, P.; MINGARRO, M.; CALDUCH-GINER, J.A.; MEDALE, F.; MARTIN, S.,A.,M.; HOULIHAN, D.F.; KAUSHIK, S.; PEREZ-SANCHEZ, J. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 232, p. 493–510, 2004.

GUZMÁN, J., M.; VIANA, M. T. Growth of abalone *Haliotis fulgens* fed diets with and without fish meal, compared to a commercial diet. **Aquaculture**, v. 165, n. 3-4, p.321-31, 1998

HA, N.; JESUS, G. F. A.; GONCALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SUGAI, J. K.; PESSATTI, M. L. ; FABREGAT, T. E. H. P. Sardine (*Sardinella spp.*) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture** , v. 500, p. 99-106, 2019.

HALL, G. M.; AHMAD, N. H. Functional properties of fish protein hydrolysates. In: HALL, G. M. **Fish Processing Technology**. Black Academic & Professional. New York: VCH Publishers. 1992. 248-274 p.

HALVER, J. E., HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. 3rd. version. Elsevier Science, San Diego, USA. 2002. 839 p.

HALVER, J.E. AND HARDY, R.W. **Fish Nutrition**. In: Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, G., Eds., *The Lipids*, 3rd Edition, Academic Press, California, 2002. 182-246p.

HARDY, R. W. **Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss***. In: WEBSTER, C. D.; LIM, C. E. *Nutrient Requirements and feeding of finfish for Aquaculture*. New York: CABI Publishing, 2002. 184-202p.

HORN, S.J., ASPMO, S.I., EIJSINK, V.G.H. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. **J. Appl. Microbiol**, v.99, p.1082-1089, 2005.

HORWITZ, W. **Official Methods of AOAC International**. 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg, 2000

KHOSRAVI, S.; BUI, H. T. D.; RAHIMNEJAD, S.; HERAULT, M.; FOURNIER, V.; JEONG, J. B.; LEE, K. -J. Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged with *Edwardsiella tarda*. **Aquaculture Nutrition**, 2014.

KOTZAMANIS, Y.P., GISBERT, E., GATESOUBE, F.J., ZAMBONINO Infante, J., CAHU, C. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol**, v.147, p.205-214, 2007.

KRISTINSSON, H. G. **Aquatic food protein hydrolysates. Maximising the value of marine by-products**. Woodhead Publishing, p. 229-248, 2007

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 43-81, 2000

KROGDAHL, Å., NORDRUM, S., SØRENSEN, M., BRUDESETH, L. & RØSJØ, C. (1999) Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Aquac. Nutr.**, v.5, p. 121–133, 1999.

LIASET, B., LIED, E., ESPE, M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 581–589., 2000

LIASET, B., & ESPE, M. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. **Process Biochemistry**, v.43, n. 1, p. 42-48, 2008.

LONG, Zhang-qiang; ZHOU, Fan; WANG, L.L.; SHAO, Q.J. Effects of starvation and re-feeding on body weight, tissue biochemical composition and hepatic digestive enzyme activity in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* [J]. **Journal of Fishery Sciences of China**, v. 4, 2008.

LORENZ, Evandro Kleber, et al. Performance, hematology and immunology of *Salminus brasiliensis* fed diets containing swine liver hydrolysate. **Aquaculture** , v.483, p. 46-52, 2018

LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of food. **Analytical Biochemistry** p. 109, 192-197, 1980

MAIZ, H.; GUADIX, E.; GUADIX, A.; GARGOURI, M.; ESPEJO-CARPIO, F. Valorisation of tuna viscera by endogenous enzymatic treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, 2018.

MARTINS, V. G., COSTA, J. A. V., & PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, v. 32, p. 61–66, 2009.

METON, I., MEDIAVILLA, D., CASERAS, A., CANTO, E., FERNANDEZ, F., Baanante, I. V, Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of

glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Br J Nutr.**, v. 82, p. 223–232, 1999.

MOON, T. W.; FOSTER, G. D.; PLISETSKAYA E. M. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 2189-2193, 1989.

NATT, M. P., HERRICK, C. A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v.31, p. 735-738, 1952

NAZEER, R. A.; DEEPHTA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyraena barracuda*) and Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209-216, 2011

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of Food Engineering**, v.70, p. 571–578, 2005

NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, USA: National academies press. 2011.

OLIVA-TELES, A.; CERQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, P. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 179, p.195–201, 1999.

OLSEN, RL; TOPPE, J; KARUNASAGAR, I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36 n. 2, p.144-51, 2014.

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **J. Aquat. Food Prod. Technol.**, v. 5, p. 43, 1996.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA JR, J.; BERNÁRDEZ, M. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 83–88, 2003.

PEDERSEN, B.; **Removing bitterness from protein hydrolysates**. Food technology (USA). 1994.

PERES, H.; SANTOS, S; OLIVA-TELES, A;. Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish physiology and biochemistry**, p.1339-47, 2014.

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; GUEDES, M. J.; MORALES, A. E.; OLIVA-TELES, A. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. **Aquaculture**, v. 265, p. 325–335, 2007

PLASCENCIA-JATOMEA, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; ARREDONDO-FIGUEROA, J. L.; HALL, G. M.; SHIRAI, K. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 7, p. 753-759, 2002.

QARA, S.; NAJAFI, M. B. H. Bioactive properties of Kilka (*Clupeonella cultriventris caspi*) fish protein hydrolysates. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2263-2270, 2018.

RIBEIRO, M. S; FONSECA, F. A.L.; QUEIROZ, M. N.; AFFONSO, E. G.; CONCEIÇÃO, L.E.C.; GONÇALVES, L, U. Fish protein hydrolysate as an ingredient in diets for arapaima *gigas* juveniles. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 44, p. 85-92, 2017.

RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3 n. 9, p. 765-791, 2011.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J. M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food Bioprocess Technol.**, v. 5, p. 73-79, 2012.

SCHAGGER, H. **Tricine-sds-page**. Nature protocols 1, 16, 2006.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo: Editora-Livraria Varela, v. 517, p. 139-157, 1996.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285–293, 1995.

SHERIFF, Sheik Abdulazeez, et al. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. **Saudi journal of biological sciences**, v. 21, n.1, p. 19-26, 2014

SOUISSI, N.; JRIDI, M.; SLAMA, R. B.; REBAH, F. B., NASRI, M. Sardinelle by-product hydrolyzates as nitrogen source for microbial growth and protease production. **Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)**, v.17,n.11, 2018.

STEPANOWSKA, K; NEDZAREK, A; RAKUSA-SUSZCZEWKI,S. Effects of starvation on the biochemical composition of blood and body tissue in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) and excreted metabolic products. **Polar Biosci** v. 20, p. 46–54, 2006.

SUZER, Cüneyt, et al. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture** , v.280 , n. .1-4, p. 140-145, 2008.

SVOBODOVA, Z; PRAVDA, D; PALACKOVA, J. **Unified methods of haematological examination of fish**. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany, Edition Methods No. 20, 1991. 31p

TONHEIM, S. K., et al. In vitro digestibility of water-soluble and water-insoluble protein fractions of some common fish larval feeds and feed ingredients. **Aquaculture**, v. 262, n.2-4 , p. 426-435, 2007.

THORGAARD, Gary H., et al. Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 13, n.4, p. 609-646, 2002.

VIEIRA, G. H. F.; MARTIN, A. M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; OMAR, S.; GONCALVES, R. C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. **J Sci Food Agric**, v. 69, p.61-65, 1995.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

WANG, Y. Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fingerlings. **Aquacult. Nutr.**, v.17,p.372-378, 2011.

WHITE, A., HART, R.J., FRY, J.C.,. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **J Automat Chem.**, v.8, p.170–177, 1986

WOSNIAK, B.; MELIM, E. W. H.; HA, N.; UCZAY, J.; PILATTI, C.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, p. 957-966, 2016.

ZAMORA-SILLERO, J.; KÜTTER, M. T.; TESSER, M. B.; MONSERRAT, J. M.; PRENTICE, C. Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 110-118, 2018.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos apresentados foi possível observar que as enzimas endógenas das vísceras de sardinha são viáveis para a produção de hidrolisado. O processo autolítico produziu um ingrediente com uma caracterização promissora, uma vez que é observada uma porcentagem alta de pequenos peptídeos. A falta de palatabilidade prejudicou o desenvolvimento dos animais. Técnicas de processamento para retirada do amargor necessitam ser estudadas e realizadas com esse ingrediente. A falta de palatabilidade não deve ser encarada como motivo de inviabilização deste produto. Ao final da pesquisa surgiu a hipótese de que o excesso de lipídeos influenciou na secagem dos hidrolisados fazendo com que o processamento de secagem possa ter contribuído para piora do sabor. Porém esta hipótese necessita ser investigada. A fisiologia e o metabolismo das trutas foram influenciados pelo consumo, fazendo com que seja difícil concluir as interferências nutricionais projetadas pelos hidrolisados. Entretanto as alterações na atividade das proteases alcalinas demonstram que os hidrolisados podem ser favoráveis ao desenvolvimento das trutas arco-iris. Dessa forma, os hidrolisados podem ser promissores, mas futuros estudos sem a influência da palatabilidade necessitam ser realizados.

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. **Enzyme hydrolysis of food proteins**. England: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 427 p.

AGUIRRE, P.; MEDALE, F.; KAUSHIK, S. J. Influence de la nature des glucides alimentaires sur l'utilisation de 2 sources protéiques par la truite Arc-en-ciel élevée à 8° ou 18°C. **Reproduction Nutrition Development**, v. 35, p. 129-136, 1995.

AKSNES, A.; HOPE, B.; JÖNSSON, E.; BJÖRNSSON, B. T.; ALBREKTSSEN, S.; Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. **Aquaculture**, v. 261, p. 305-317, 2006.

ALEMAN, A.; GIMENEZ, B.; MONTERO, P.; GOMEZ-GUILLEN, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 407-413, 2011.

AMORIM, R. G. O.; DESCHAMPS, F. C.; PESSATTI, M. L. Protein hydrolysate waste of whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) as a way of adding value to fish and reducing the environmental liabilities of the fishing industry. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 5, p. 967-974, 2016.

ANANTHARAMAN, K.; FINOT, P. A. Nutritional aspects of food proteins in relation to technology. **Food Review International**, v. 9, p. 629-655, 1993.

ASPMO, S. I.; HORN, S. J.; EIJSINK, V. G. H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1957-1966, 2005.

BAEL, J.; AZAD, A. K.; SEONGHUN W.; HAMIDOGHLI A.; MINJI S.; SUNGCHUL C. B.; Effects of enzymatically hydrolyzed fish byproducts in diet of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 22, n. 1, 2019.

BARKIA, A.; BOUGATEF, A.; KHALED, H. B.; NASRI, M. Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 303-320, 2010.

BATISTA, I.; PIRES, C.; NUNES, M. L. **Hidrolisados Proteicos de Pescado: preparação, propriedades e utilização**. v. 14. Publicações Avulsas: IPIMAR, 2006.

BATISTA, I. **Hidrolisados proteicos de pescado**. In: GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011, 386-398p.

BENITEZ R. A.; PAGAN, I. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 2, p. 227-236, 2008.

BERGE, G. M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v. 145, p. 205-212, 1996.

BOUGATEF A.; NEDJAR-ARROUME, N.; RAVALLEC-PLE, R.; LEROY, Y.; GUILLOCHON, D.; BARKIA, A.; NASRI, M. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food Chemistry**, v. 111, p. 350–356, 2008.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; JUNQUEIRA, R. G.; SILVESTRE, M. P. C. Otimização da hidrólise da caseína para elevar o teor de pequenos peptídeos: emprego da pepsina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 625-634, 2003.

CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. (Org.). **Plano de gestão para o uso sustentável de Sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil**. Brasília: IBAMA, 2011.180 p.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, p. 3020-3038, 2012.

DEKKERS, E.; RAGHAVAN, S.; KRISTINSSON, H. G.; MARSHALL, M. R. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 124, p. 640-645, 2011.

DERAZ, S. F.; EL-FAWAL, G. F.; ELLATIF, S. A.; KHALIL, A. A. Autohydrolysed Tilapia nilotica Fish Viscera as a Peptone Source in Bacteriocin Production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 171-175, 2011.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAU, M. E.; BERGÉ, J. P. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 89, p. 1599-1606, 2009.

ENNAS, N.; HAMMAMI, R.; BEAULIEU, L.; FLISS, I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p. 195-200, 2015.

ESPE, M.; SVEIER, H.; HØGØY, I.; LIED, E. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. **Aquaculture**, v. 174, p. 119–137, 1999.

FABREGAT, T. E. H. P.; WOSNIAK, B.; GONÇALVES, A. F. N.; SKORONSKI, E.; PESSATTI, M. L. Frações solúveis e insolúveis do hidrolisado proteico de resíduo de sardinha na alimentação do jundiá: consumo de ração e excreção de amônia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1713-1720, 2016.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018**. Roma: FAO, 2018. 196 p.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 1096 p.

GISBERT, E.; FOURNIER, V.; SOLOVYEV, M.; SKALLI, A.; ANDREE, K. B. Diets containing shrimp protein hydrolysates provided protection to European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) affected by a *Vibrio pelagius* natural infection outbreak. **Aquaculture**, v. 495, p. 136–143, 2018.

GOOSEN, N. J.; WET, L. F.; GÖRGENS, J. F. The effects os protein hydrolysates ont the immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 428-429, p. 243-248, 2014.

HA, N; JESUS, G. F. A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N.S; SUGAI, J.K.; PESSATTI, M. L; MOURINO, J. L . FABREGA, T. E. Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. **Aquaculture**, v. 500, p. 99-106, 2019.

HALL, G. M.; AHMAD, N. H. Functional properties of fish protein hydrolysates. In: HALL, G. M. **Fish Processing Technology**. New York: VCH Publishers. 1992. 248-274p.

HE, S.; ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 289-297, 2013.

HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; NADIAH, W. A. W. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 195-207, 2011.

HORWITZ, W. **Official Methods of AOAC International**. 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg, 2000.

HEVRØY, E. M.; ESPE, M.; WAAGBØ, R.; SANDNES, K.; RUUD, M.; HEMRE, G-I. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 301-313, 2005.

HERMANNSDOTTIR, R.; JOHANNSDOTTIR, J.; SMARADOTTIR, H.; SIGURGISLADOTTIR; S. GUDMUNDSOTTIR; B. K.; BJORNSDOTTIR, R. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 136-143, 2009.

HSU, K. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**, v. 122, p. 42-48, 2010.

KARNJANAPRATUM, S.; O'CALLAGHAN, Y. C.; BENJAKUL, S.; O'BRIEN, N. Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatina hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 3220-3226, 2016.

KIM, S.; WIJESEKARA, I. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 1-9, 2010.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; YACHAI, M.; VISESSANGUAN, W.; SHAHIDI, F.; HAYES, K. D. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). **Journal of Food Science**, v. 74, p. 126-133, 2009.

KOUAKOU, C.; BERGÉ, J. P.; BARON, R.; LETHUAUT, L.; PROST, C.; CARDINAL, M. Odor modification in salmon hydrolysates using the Maillard reaction. **Journal of aquatic food product technology**. v. 23, n. 5, p. 453-467, 2014.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40. p. 43-81, 2000.

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technol.**, v.48, n.10. p. 68-71, 1994.

LIASET, B.; NORTVEDT, R.; LIED, E.; ESPE, M. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 68-71, 2002.

LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1747-1759, 2003.

LORENZ, E. K.; BARONE, R. S.; FRANÇA, W.G.; SABIONI, R. E.; KOCH, J. F.; CYRINO, J. E. Performance, hematology and immunology of *Salminus brasiliensis* fed diets containing swine liver hydrolysate. **Aquaculture**, v. 483, p. 46-52, 2018.

MAIZ, H.; GUADIX, E.; GUADIX, A.; GARGOURI, M.; ESPEJO-CARPIO, F. Valorisation of tuna viscera by endogenous enzymatic treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, 2018.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technol.** v. 48, p. 89-95, 1994.

MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; CHAMORRO, S., BRENES, A. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. **Food Research International**. v. 73, p. 204-212, 2015.

MORALES-MEDINA, R.; TAMM, F.; GUADIX, A. M.; GUADIX, E. M.; DRUSCH, S. Functional and antioxidante properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. **Food Chemistry**, v.194, p. 1208-1216, 2016.

NAKAJIMA, K.; YOSHIE-STARK, Y.; OGUSHI, M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 114, p. 844–851, 2009.

NGUYEN, H. T. M.; PEREZ-GALVEZ, R.; BERGE, P. J. Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 324, p. 127–134, 2012.

NAZEER, R. A.; DEEPTHA, R.; JAIGANESH, R.; SAMPATHKUMAR, N. S.; NAQASH, S. Y. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyraena barracuda*) and Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 17, p. 209–216, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios da bioquímica** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NEVES, R. A. M. **Hidrolisados proteicos de pescado: caracterização e proposta de uso como suporte nutricional**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2001.83p.

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 5, p. 43, 1996.

OLSEN, R. L.; TOPPE, J.; KARUNASAGAR, L. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. **Trends in Food Science e Technology**, v. 36, p. 144-151, 2014.

OVISSIPOUR, M.; ABEDIAN KENARI, A.; MOTAMEDZADEGAN, A.; RASCO, B.; SAFARI, R.; SHAHIRI, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**, v. 115, p. 238-242, 2009.

PASUPULETI, V. K.; BRAUN, S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. **Protein hydrolysates in biotechnology**. Springer: Dordrecht, 2008. 11-32.

PASTORIZA, L.; SAMPEDRO, G.; CABO, M. L.; HERRERA JR, J.; BERNÁRDEZ, M. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 83-88, 2003.

- RAJARAM, D.; NAZEER, R. A. Antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from marine fishes *Lepturacanthus savala* and *Sphyraena barracuda*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, p. 435-444, 2010.
- REFSTIE, S.; OLLI, J. J.; STANDAL, H. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. **Aquaculture**, v. 239, p. 331-349, 2004.
- ROBERT, M.; ZATYLNÝ-GAUDIN, C.; FOURNIER, V.; CORRE, E.; LE CORGUILLÉ, G.; BERNAY, B.; HENRY, J. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 487-492, 2015.
- RYAN, J. T.; ROSS, R. P.; BOLTON, D.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. **Nutrients**, v. 3, n. 9, p. 765-791, 2011.
- SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). **Food Chemistry**, v. 107, p. 768-776, 2008.
- SANTOS, R.C; RODRIGUES-RIBEIRO, M. **Demanda de iscas vivas para a frota atuneira catarinense na safra de 1998/99: CPUE, composicao e distribuicao das capturas**. Notas Técnicas da Facimar, 2000.p.97-101
- SEE, S. F.; HOO, L. L.; BABJI, A. S. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1359-1365, 2011.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.; SYNOWIECKI, J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, v. 53, p. 285-293, 1995.
- SIEMENSMA, A. O.; WEIJER, W. J.; BAK, H. J. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. **Trends in Food Science e Technology**, v. A, p. 16-21, 1993.

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHU, T. B.; BEZERRA, R. S. **Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate.** *Animal Feed Science and Technology*, v. 196, 2014. 96–106p.

SLIZYTÉ, R.; MOZURAITYTÉ, R.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; FALCH, E.; FOUCHEREAU-PERON, M.; RUSTAD, T. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 668-677, 2009.

STORI, F. T.; BONILHA, L. E. C.; PESSATTI, M. L. **Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos.** In: Instituto Ethos de Empresas e Responsabilidade Social. *Jornal Valor Econômico. Responsabilidade social das empresas.* São Paulo, 2002. 373-406p.

TORRUCO-UCO, J. G.; DOMINGUEZ-MAGAÑA, M. A.; DAVILA-ORTIZ, G.; MARTINEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L. A.; BETANCURANCONA, D. A. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen 12 natural: una revisión. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 6, n. 2, p. 158-168, 2008.

VENTURIN, A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SKORONSKI, E.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Soluble fraction of sardine protein hydrolysates in the feeding of the South American catfish. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 4, p. 878-888, 2016.

VIEIRA, G. H. F.; MARTIN, A. M.; SAKER-SAMPAIAO, S.; OMAR, S.; GONCALVES, R. C. F. Studies on the enzymatic hydrolysis of brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 61-65, 1995.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food chemistry**, v. 224, p. 160-171, 2017.

WALD, M.; SCHWARZ, K.; REHBEIN, H.; BUBMANN, B.; BEERMANNM C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. **Food Chemistry**, v. 205, p. 221-228, 2016.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. E. **Nutrient Requirements and feeding of finfish for Aquaculture.** New York: CABI Publishing, 2002. 421 p.

WOSNIAK, B.; MELIM, E. W. H.; HA, N.; UCZAY, J.; PILATTI, C.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, p. 957-966, 2016.

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. London: Academic, 1975.123-179.p.

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1739-1743, 2009.

ZIEGLER, F.; OLLIVIER, J. M.; CYNOBER, L.; MASINI, J. P.; COUDRAYLUCAS, C.; LEVY, E.; GIBONDEAU, J. Efficacy of enteral nitrogen support in surgical patients; small peptides vs. Nondegraded proteins. **Gut**, v. 31, p. 1277-1283, 1990.