

NATALIA HA

**HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE MÚSCULO DE SARDINHA *Sardinella spp.* COMO
PROMOTOR DE CRESCIMENTO E SAÚDE PARA PEIXES**

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat

Co-orientadora: Profa. Dra. Jaqueline Dalbello Biller-
Takahashi

**LAGES
2019**

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

Ha, Natalia

Hidrolisado proteico de resíduo de músculo de sardinha
Sardinella spp. como promotor de crescimento e saúde para peixes /
Natalia Ha. -- 2019.
87 p.

Orientador: Thiago El Hadi Perez Fabregat

Coorientadora: Jaqueline Dalbello Biller-Takahashi

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Desempenho zootécnico. 2. Hidrólise enzimática. 3.
Microbiologia intestinal. 4. Peptídeos biologicamente ativos. 5.
Subprodutos de pescado. I. Fabregat, Thiago El Hadi Perez . II.
Biller-Takahashi, Jaqueline Dalbello. III. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

NATALIA HA
HIDROLISADO PROTEICO DE RESÍDUO DE MÚSCULO DE SARDINHA
***Sardinella* spp. COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO E SAÚDE PARA**
PEIXES

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de doutora em Ciência Animal

Banca examinadora

Orientador:



Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat
(Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/Lages -SC)

Membro:



Prof. Dr. Carlos Brentice-Hernández
(Universidade Federal do Rio Grande – FURG/Rio Grande - RS)

Membro:



Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño
(Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC/Florianópolis - SC)

Membro:



Prof. Dr. Everton Skoronski
(Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/Lages - SC)

Membro:



Prof. Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães
(Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/Lages - SC)

Lages, 25/02/2019

Aos meus pais Myong Song Ha e Ye Koung Gu Ha,

Aos meus irmãos Stéfano Ha e Viviane Ha, e cunhado Márcio Sadao Yano,

Às minhas sobrinhas Milenna Ha e Mariana Ha,

À minha melhor cãopanhia Lilica,

Por todo amor, apoio, carinho e dedicação...

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado, guiando e iluminando o meu caminho com muito amor.

À minha família, pai, mãe, oppah, onnih, Dao, Mimi e Mama por sempre estarem ao meu lado, por toda dedicação e amor.

Ao Prof. Dr. Thiago El Hadi Perez Fabregat pela orientação e ensinamentos.

Aos Prof. Dr. Carlos Prentice, Prof. Dr. Everton Skoronski, Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño e Profa. Dra. Maria de Lourdes de Magalhães, pelas valiosas sugestões e participação na banca avaliadora.

Ao Prof. Marcos Luiz Pessatti pela orientação na fabricação e análise dos hidrolisados e por toda ajuda fornecida durante os períodos que passei na UNIVALI – Itajaí/SC. A Carla Camila Bazi, a Haluko Massago e a Miyoko Massago pela amizade e por toda ajuda durante a estadia em Itajaí.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pedreira Mouriño pela parceria e orientação durante experimento realizado no Laboratório de Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS)/Departamento de Aquicultura da UFSC-Florianópolis/SC. A toda a equipe que me ajudou durante o experimento e nas coletas realizadas, em especial, a Profa. Patrícia Garcia, Gabriel Fernandes Alves Jesus, Hugo Mendes de Oliveira, Marcela Yamashita, Marcos Shizuo Owatari, Mayara Schueroff Siqueira, Scheila Anelise Pereira.

À Profa. Dra. Juliet Kiyoko Sugai pela orientação, parceria e dedicação na realização das análises enzimáticas no Laboratório de Enzimologia Aplicada/ Departamento de Bioquímica da UFSC-Florianópolis/SC.

Ao Prof. Everton Skoronski pela disponibilidade do uso do Laboratório de Tratamento de Água e Resíduos (LABTRAT) da UDESC-CAV/SC e por toda sua ajuda e da equipe, em especial, à Darleila Costa, ao Diego Hoefling e à Mylena Fernandes.

À Profa. Mere Erika Saito pela disponibilidade do uso do Laboratório Clínico Veterinário/ Departamento de Medicina Veterinária da UDESC-CAV/SC e pela ajuda da equipe, em especial, à Carla Dezan L. Cancelier.

Ao Juliano Uczay por toda a ajuda com análises laboratoriais.

A todos que fizeram parte do Laboratório de Piscicultura da UDESC-CAV, por toda ajuda, trabalho em equipe e amizade: André Fernando Nascimento Gonçalves, Beatriz Silva da

Silveira, Camila Ceccato, Camila de Souza Magela Menezes, Emanuel Danieli Favaretto, Erick William Hessa Melim, Felipe Anderson Pereira, Fernanda Regina Delziovo, Juliano Uczay, Kayane Pereira Besen, Larissa da Cunha, Luiz A. Cipriani, Karoline Rocha Nunes, Manuela Martins Pereira, Nandara Soares de Oliveira, Naor Silveira Fialho, Rafaela Gomes, Samara Campos Nascimento, Prof. Thiago El Hadi Perez Fabregat.

A todos os professores, funcionários, técnicos de laboratório da UDESC-CAV/Lages-SC, em especial aos funcionários da secretaria Ederson, Leandro e Lara, por toda dedicação e auxílio nesses anos.

Ao Luiz Augusto Cipriani e a sua família por toda a ajuda e companheirismo na reta final.

À Lilica, minha filhinha de quatro patas, por todo amor e carinho incondicionais.

A todos os meus familiares e amigos que ajudaram direta ou indiretamente nesta etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa de doutorado concedida durante todo o curso.

MUITO OBRIGADA!!!

“Nunca desanimeis, embora venham ventos contrários”

Madre Paulina

RESUMO

Ha, Natalia. **Hidrolisado proteico de resíduo de músculo de sardinha *Sardinella* spp. como promotor de crescimento e saúde para peixes.** 2019. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, SC, 2019.

O hidrolisado proteico de pescado (HPP) é um produto constituído por peptídeos de baixo e alto peso molecular e por aminoácidos livres. O HPP é considerado uma fonte de peptídeos biologicamente ativos, e estes peptídeos, em adição ao seu valor nutricional, possuem também efeitos fisiológicos sobre o organismo. Anti-hipertensivos, agonista de opioides, imunomodulatórios, antimicrobianos e prebióticos são alguns destes efeitos. O primeiro estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação dietética com o hidrolisado proteico de resíduo de músculo de sardinha (*Sardinella* spp.) (SPH) sobre o desempenho zootécnico, a atividade de enzimas digestivas, a morfologia e a microbiologia intestinal de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). O experimento teve duração de 56 dias e o delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (0, 2, 5 e 10% de SPH) e seis repetições. Neste período, 480 jundiás ($11,3 \pm 2,46$ g) foram alimentados até a saciedade aparente. O objetivo do segundo experimento foi avaliar o perfil de peptídeos dos hidrolisados proteicos de sardinha sobre as respostas de desempenho zootécnico, composição corporal, reservas energéticas teciduais, parâmetros hematológicos e bioquímicos, parâmetros de metabolismo proteico, antioxidantes nos tecidos e microbiologia intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os tratamentos foram: controle (sem SPH); SPH com grau de hidrólise (GH) baixo (5,5%); SPH com GH intermediário (27,9%) e SPH com GH alto (62,5%). O SPH substituiu 5% da proteína total das dietas. Durante 56 dias, 180 tilápias ($6,16 \pm 2,0$ g) foram alimentadas até a saciedade aparente. Nos dois experimentos, os SPH foram produzidos com carcaças de sardinha utilizando complexo de protease bacteriana, e foram caracterizados quanto ao grau de hidrólise e perfil de peptídeos de acordo com o peso molecular. No primeiro experimento, independente dos níveis de inclusão nas dietas, a média de ganho de peso (GP) (36,28 g), taxa de crescimento específico (TCE) ($2,56\% \text{ dia}^{-1}$), consumo alimentar aparente (40,51 g) e conversão alimentar aparente (CA) (1,12) foram melhores quando comparado ao tratamento controle (médias de 24,95 g; $2,11\% \text{ dia}^{-1}$; 31,00 g e 1,28, respectivamente). Com a inclusão de 5% de SPH, houve aumento da atividade de enzimas digestivas e de bactérias ácido lácticas nos intestinos dos peixes. Houve efeito prebiótico no peixe e observou-se que os níveis de inclusão podem determinar os efeitos do SPH. No segundo experimento, os SPH apresentaram predominância de peptídeos de alto peso molecular, mas com a distribuição dos peptídeos de pesos moleculares diferentes. Os resultados deste estudo mostraram que os hidrolisados foram pouco consumidos (53,03 g) quando comparados com o controle (65,91 g). Os valores de desempenho dos tratamentos com a inclusão do hidrolisado tiveram médias de GP (36,93 g), TCE ($3,46\% \text{ dia}^{-1}$), CA (1,45) piores do que o controle (GP 54,22 g; TCE $4,08\% \text{ dia}^{-1}$; CA 1,22). As análises hematológicas e bioquímicas do sangue não foram afetadas. As dietas com inclusão de hidrolisado afetaram a população microbiana, o que indica a possibilidade de usar este ingrediente para modular as populações intestinais.

Palavras-chave: Desempenho zootécnico. Hidrólise enzimática. Microbiologia intestinal. Peptídeos biologicamente ativos. Subprodutos de pescado.

ABSTRACT

Ha, Natalia. **Protein hydrolysate of sardine (*Sardinella* spp.) muscle residue as growth promoter and health for fish.** 2019. 87 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Agroveterinary Science Center (UDESC/CAV). Postgraduate Program on Animal Science, Lages, SC, 2019.

Fish protein hydrolysate (FPH) is a product constituted by peptides of low and high molecular weight and free amino acids. The FPH is considered a source of biologically active peptides and, in addition to its nutritional value, these peptides have physiological effects over the organism. Anti-hypertensives, agonist to opioids, immunomodulatory, antimicrobials and prebiotics are some of these effects. The first study was performed with the objective of evaluate the effects of the dietary supplementation with protein hydrolysate of sardine muscle residue (*Sardinella* spp.) (SPH) over the growth performance, digestive enzymes activity, intestinal morphology and microbiology of South American catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). The experiment had the duration of 56 days and the design was entirely randomized with four treatments (0, 2, 5 and 10% of SPH) and six repetitions. On this period, 480 South American catfish (11.3 ± 2.46 g) were fed until apparent satiety. The objective of the second experiment was evaluate the peptides profile of the protein hydrolysates of sardine over the answers of growth performance, corporal composition, tissue energetic reserves, hematological and biochemical parameters, parameters of protein metabolism, antioxidants on tissues and intestinal microbiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. The treatments were: control (without SPH); SPH with low degree of hydrolysis (DH) (5.5%); SPH with intermediary DH (27.9%) and SPH with high DH (62.5%). The SPH substituted 5% of total dietary protein. For 56 days, 180 tilapias (6.16 ± 2.0 g) were fed until apparent satiety. On both experiments, the SPH were produced with sardine carcasses by utilizing complex of bacterial protease and were characterized regarding the degree of hydrolysis and the peptide profile according to the molecular weight. In the first experiment, regardless of the SPH inclusion levels in the diets, average weight gains (WG) (36.28 g), specific growth rate (SGR) ($2.56\% \text{ day}^{-1}$), apparent feed intake (FI) (40.51 g) and apparent feed conversion rate (FCR) (1.12) were improved when compared to the control treatment (average of 24.95 g; $2.11\% \text{ day}^{-1}$; 31.00 g and 1.28, respectively). With the inclusion of 5% of SPH, there was enhancement of digestive enzymes activity and of lactic acid bacteria in the fish intestines. There was prebiotic effect on the fish and it was observed that the inclusion levels may determine the SPH effects. In the second experiment, the SPH showed predominance of high molecular weight peptides, although with the distribution of the peptides with different molecular weights. The results of this study showed that the treatments with hydrolysates were poorly consumed (53.03 g) when compared to the control treatment (65.91 g). The growth performance values of the treatments with the inclusion of the hydrolysate had averages of WG (36.93 g), SGR ($3.46\% \text{ day}^{-1}$), FCR (1.45) worse than the control treatment (WG 54.22 g; SGR $4.08\% \text{ day}^{-1}$; FCR 1.22). The hematological and biochemical analysis of the blood were not affected. The diets with inclusion of hydrolysate affected the microbial population, which indicates the possibility to use this ingredient to module the intestinal populations.

Keywords: Growth performance. Enzymatic hydrolysis. Intestinal microbiology. Biologically active peptides. Fish by-products.

APRESENTAÇÃO

Esta tese contém três capítulos, sendo que nesses se encontram os seguintes manuscritos:

- **Capítulo 1** – Considerações gerais. Este capítulo está nas normas do Manual do Udesc/CAV.
- **Capítulo 2** – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título “Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology”. Este capítulo apresenta o artigo publicado no periódico “Aquaculture” na íntegra (Aquaculture, v. 500, p. 99-106, 2018).
- **Capítulo 3** – Manuscrito elaborado na forma de artigo científico com o título: “O perfil de peptídeos do hidrolisado proteico de sardinha afeta a utilização do alimento e a microbiota intestinal de tilápias-do-Nilo”. Este manuscrito está de acordo com as normas do periódico “Aquaculture Research”.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Quadro 1 – Perfil de peptídeos de hidrolisados proteicos de pescado	34
---	----

Capítulo 2

Figura 1 – Concentration of <i>Vibrionaceae</i> , total heterotrophic bacteria and total lactic microorganisms (CFU.g ⁻¹ intestine) of South American catfish fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days. The intestines were incubated in TCBS for <i>Vibrionaceae</i> , in TSA for total heterotrophic bacteria and in MRS for total lactic microorganisms	54
Figura 2 – Histological organization of the intestine of South American catfish juveniles fed with different diets after 56 days. A: diet without hydrolysate. B: diet supplemented with 2% of sardine protein hydrolysate (SPH). C: diet supplemented with 5% of SPH. D: diet supplemented with 10% of SPH.....	55

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Table 1 – Composition of the sardine (<i>Sardinella</i> spp.) protein hydrolysate.....	48
Table 2 – Distribution of peptides in sardine (<i>Sardinella</i> spp.) protein hydrolysate.....	49
Table 3 – Composition of the experimental diets.....	50
Table 4 – Productive performance of South American catfish juveniles fed diets with inclusion levels of 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days.....	53
Table 5 – Specific activity of total alkaline protease and amylase in the gastrointestinal tract of South American catfish juveniles fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days	54
Table 6 – Morphometry of the gastrointestinal tract of South American catfish juveniles fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days.	55

Capítulo 3

Tabela 1 – Composição do hidrolisado proteico de sardinha (<i>Sardinella</i> spp.).....	71
Tabela 2 – Distribuição de peptídeos dos hidrolisados proteicos de sardinha (<i>Sardinella</i> spp.)	71
Tabela 3 – Composição das dietas experimentais	72
Tabela 4 – Índices de desempenho zootécnico de juvenis de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise	75
Tabela 5 – Composição corporal de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise	76
Tabela 6 – Parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise	76
Tabela 7 – Glicose, colesterol e triglicerídeos e glicogênio no fígado e concentração de amônia, aminoácidos e proteína no fígado e músculo de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise	77
Tabela 8 – TBARS e NPSH no fígado e músculo de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise	78
Tabela 9 – Concentração de bactérias por grama de intestino (UFC g ⁻¹) de tilápias alimentadas com dietas suplementadas com hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise por 84 dias. Onde os intestinos foram cultivados em TCBS para vibrionáceas, TSA para bactérias heterotróficas totais e MRS para bactérias ácido-láticas totais	78

LISTA DE ABREVIACÕES

Aa	Aminoácidos
ANOVA	Analysis of variance
AOAC	ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS
CFU	Total colony-forming units
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
cm	Centímetros
Da	Daltons
DH	Degree of hydrolysis
dl	Decilitros
DP	Desvio padrão
EE	Ethereal extract
FCR	Apparent feed conversion rate
FI	Apparent feed intake
g	Gramas
GE	Gross energy
GH	Grau de hidrólise
GP	Gross protein
h	Horas
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Harris-Eosin
HGB	Hemoglobina
HPP	Hidrolisado proteico de pescado
HTC	Hematócrito;
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
l	Litros
ln	Logarítmo natural
m	Minutos
mA	Miliampères
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
MM	Mineral matter
mmol	Milimol
MRS	Man Rogosa Sharpe
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
NPSH	Teor de tióis (-SH) proteicos e não proteicos
pg.cel ⁻¹	Picograms per cell
pH	Potencial hidrogeniônico
PPT	Proteína plasmática total
OPA	O-phthalaldehyde
RBC	Número de eritrócitos
SAS	Statistical Analysis Software
SGR	Specific growth rate
SH	Teor de tióis
SPH	Sardine protein hydrolysates
SSE	Solução salina estéril
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCBS	Thiosulfate citrate bile sucrose ou tiosulfato citrato bile sacarose
TSA	Tryptone soy agar ou triptona de soja
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultraviolet
WG	Weight gain
V	Voltagem
VCM	Volume corpuscular médio
µg	Microgramas
µl	Microlitros

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	25
1.1 INTRODUÇÃO.....	25
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
1.2.1 Resíduos da Indústria Pesqueira	26
1.2.2 Hidrolisado Proteico de Pescado	27
1.2.2.1 Produção e Caracterização dos HPP.....	28
1.2.2.2 Perfil de peptídeos	29
1.2.2.3 Efeitos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos HPP.....	31
1.2.3 Modelos Biológicos.....	35
1.2.3.1 Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	35
1.2.3.2 Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
2 CAPÍTULO 2 - SARDINE (<i>Sardinella</i> spp.) PROTEIN HYDROLYSATE AS GROWTH PROMOTER IN SOUTH AMERICAN CATFISH (<i>Rhamdia quelen</i>) FEEDING: PRODUCTIVE PERFORMANCE, DIGESTIVE ENZYMES ACTIVITY, MORPHOMETRY AND INTESTINAL MICROBIOLOGY	45
ABSTRACT	45
2.1 INTRODUCTION	46
2.2 MATERIALS AND METHODS	47
2.2.1 Production and Characterization of Sardine Protein Hydrolysate.....	47
2.2.1.1 Hydrolysate electrophoresis	48
2.2.2 Experimental Diets	49
2.2.3 Animals and Facilities	50
2.2.4 Productive Performance.....	51
2.2.5 Enzymatic Analyses.....	51
2.2.6 Microbiological Assessments	52
2.2.7 Intestinal Morphometry	52
2.2.8 Design and Statistical Analysis	53
2.3 RESULTS	53
2.4 DISCUSSION.....	56
2.5 CONCLUSION.....	59
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	59
2.7 REFERENCES	59
3 CAPÍTULO 3 - O PERFIL DE PEPTÍDEOS DO HIDROLISADO PROTEICO DE SARDINHA AFETA A UTILIZAÇÃO DO ALIMENTO E A MICROBIOTA INTESTINAL DE TILÁPIAS-DO-NILO	67
RESUMO	67
ABSTRACT	68
3.1 INTRODUÇÃO.....	68
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	69

3.2.1	Produção e Caracterização do Hidrolisado de Resíduo de Músculo de Sardinha.....	69
3.2.2	Dietas Experimentais.....	71
3.2.3	Animais e Instalações.....	72
3.2.4	Desempenho Zootécnico	73
3.2.5	Composição Corporal.....	73
3.2.6	Reservas Energéticas Teciduais	73
3.2.7	Parâmetros Hematológicos.....	73
3.2.8	Bioquímica e Metabolismo Proteico nos Tecidos.....	74
3.2.9	Parâmetros Antioxidantes nos Tecidos	74
3.2.10	Avaliações Microbiológicas.....	74
3.2.11	Delineamento e Análise Estatística	75
3.3	RESULTADOS	75
3.3.1	Desempenho Zootécnico	75
3.3.2	Composição Corporal.....	75
3.3.3	Aspectos Sanguíneos.....	76
3.3.4	Aspectos Bioquímicos e Metabolismo Proteico dos Tecidos	76
3.3.5	Respostas Antioxidantes	77
3.3.6	Avaliações Microbiológicas.....	78
3.4	DISCUSSÃO.....	78
3.5	CONCLUSÃO	80
3.6	AGRADECIMENTOS.....	80
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A indústria do pescado vem se expandindo a cada ano e aumentando cada vez mais os resíduos oriundos do processamento do pescado (OLSEN; TOPPE; KARUNASAGAR, 2014). Os resíduos de pescado podem ser fontes de proteína, peptídeos e aminoácidos com alto potencial para o desenvolvimento de nutracêuticos (ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). Estes resíduos podem ser utilizados no desenvolvimento de subprodutos como os hidrolisados proteicos de pescado (HPP), biodiesel e biogás, produtos dietéticos (quitosana), produtos farmacêuticos (incluindo óleos), pigmentos naturais e cosméticos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2018). Com isso, além de diminuir a poluição são gerados produtos que apresentam alto valor agregado (GHALY et al., 2013). Dentre esses subprodutos, os HPP vêm se destacando devido ao seu grande potencial de utilização na aquicultura.

O HPP é produzido a partir de subprodutos da indústria pesqueira por processos que incluem a utilização de enzimas hidrolíticas, através das quais ocorre a degradação das proteínas com consequente aumento da sua digestibilidade (BERGE; STOREBAKKEN, 1996). O elevado valor nutricional qualifica o hidrolisado para ser utilizado na composição das rações em cultivos que demandam uma dieta de qualidade (ARIHARA, 2006). Além disso, a utilização da hidrólise enzimática para modificar proteínas é uma maneira eficiente de recuperar potenciais peptídeos biologicamente ativos (KIM; WIJESEKARA, 2010).

As propriedades funcionais são derivadas dos peptídeos biologicamente ativos presentes nos HPP. Entre as principais propriedades funcionais, estão a ação antioxidante, antimicrobiana, aumento da atividade das enzimas digestivas dos peixes, melhora da resposta imune (COSTA-BOMFIM et al., 2016; GARCÍA-MORENO et al., 2014; SAFARI et al., 2012; SRICHANUN et al., 2014), além da melhora no desempenho zootécnico (KHOSRAVI et al., 2015; ZHENG et al., 2013). A composição dos aminoácidos e peptídeos bioativos do HPP depende da fonte de matéria-prima, da enzima e das condições de hidrólise (KLOMPONG et al., 2009; KOTZAMANIS et al., 2007).

O HPP é um produto com potencial para ser utilizado como aditivo na aquicultura devido as suas características de melhorar a qualidade nutricional do pescado e por apresentar propriedades funcionais (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Para a obtenção de respostas positivas sobre a produção de peixes ainda devem ser estabelecidos níveis de inclusão adequados, realização de aperfeiçoamento das técnicas de produção e da caracterização dos

hidrolisados, além de serem necessários mais estudos a respeito dos efeitos benéficos do HPP em relação a crescimento e saúde dos peixes. Em face disso, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a inclusão do hidrolisado proteico de resíduo de músculo de sardinha em dietas para peixes como promotor de crescimento e saúde.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Resíduos da Indústria Pesqueira

De acordo com o relatório da FAO (2018), a produção total global da pesca atingiu 170,9 milhões de toneladas em 2016, com 90,9 milhões de toneladas de captura e 80,0 milhões de toneladas de aquicultura. Ainda conforme o relatório no mesmo ano, a quantidade de pescado destinada ao consumo humano atingiu 151,2 milhões de toneladas, sendo 19,7 milhões de toneladas destinada para produtos de fins não alimentares. Já a produção total de captura em águas marinhas apresentada no relatório foi 79,3 milhões de toneladas em 2016, sendo que, a *Sardinella* spp. estava entre os peixes marinhos mais capturados no mundo.

No Brasil, o Estado de Santa Catarina é o maior estado produtor de pesca extrativista marinha, com produção de 157.223 toneladas em 2012 (UNIVALI/CTTMar, 2013). A sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) o principal recurso pesqueiro do Brasil, responsável por cerca de 22% do pescado advindo da pesca extrativa marinha (BRASIL, 2013). As sardinhas são peixes de pequeno porte, de corpo lateralmente comprimido e prateado, que formam cardumes e habitam águas costeiras, entrando em baías e estuários. É uma espécie de vida curta e de crescimento rápido, e apresenta altas taxas de fecundidade (IBAMA, 2011). Na indústria de conservas de sardinha, são desperdiçados cerca de 40% da matéria-prima, sendo o material residual constituído de cabeças, vísceras e aparas, que, normalmente, é destinado à produção de farinha e óleo de peixe de qualidade reduzida (BATISTA et al., 2009).

Com isso, há uma grande produção de resíduos que são descartados, e muitas vezes de maneira incorreta poluindo o ambiente, ou são subutilizados, gerando produtos de baixa qualidade (ASPEVIK et al., 2016). O resíduo do beneficiamento do pescado é toda a fração não aproveitada, mas que contém características químicas semelhantes às da fração comercializada (NOLASCO, 2000). Os resíduos constituem aproximadamente 60% do pescado (FAO, 2018) o que resulta em cerca de 30 milhões de toneladas de resíduos que são descartados no mundo (DRAGNES et al., 2009). Estes resíduos são ricos em proteína de alto valor biológico (FAO, 2009; OETTERER, 2002), lisina e leucina (SHAHIDI; BOTTA, 1994), ácidos graxos da série

ômega-3 (SOCCOL; OETTERER, 2003), quitina (ASSIS; BRITTO, 2008) e taurina (DRAGNES et al., 2009).

O desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento dos resíduos gerados nas indústrias de beneficiamento de pescado vem sendo realizados com o intuito de obter-se produtos que possam ser adicionados como ingredientes em rações para organismos aquáticos, evitando desperdícios e poluição ambiental (CHALAMAIAH et al., 2012). Esses ingredientes podem reduzir custos e manter ou até melhorar a qualidade nutricional e a atratividade das dietas (ANBE, 2011). Estudos têm sido realizados para obtenção de subprodutos provenientes destes resíduos, alternativos à farinha de pescado, como os hidrolisados proteicos e a silagem (BORGHESI; ARRUDA; OETTERER, 2008).

1.2.2 Hidrolisado Proteico de Pescado

O hidrolisado proteico de pescado (HPP) é um produto solúvel, resultado da hidrólise enzimática de subprodutos do processamento de pescado (LEAL et al., 2009; MARTONE, BORLA; SANCHEZ, 2005). O processo hidrolítico deve ser realizado sob controle de temperatura, pH, quantidade de enzima, tipo de matéria-prima e tempo de hidrólise (KLOMPONG et al., 2009). Os HPP são constituídos por aminoácidos livres e peptídeos de baixo e alto peso molecular, resultantes do maior ou menor grau de hidrólise das proteínas (BATISTA, 2011).

Os benefícios da inclusão do HPP nas dietas devem-se ao efeito do tratamento enzimático, que converte as proteínas em peptídeos menores e aminoácidos livres (BHASKAR et al., 2007), facilitando a absorção das moléculas pelas células epiteliais do intestino (BAKKE et al., 2010). Esses peptídeos podem melhorar a palatabilidade (AGUILA et al., 2007; OLIVATELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999) e as propriedades nutricionais, estimulando o consumo de ração, a utilização do alimento e a melhora no crescimento (BERGE; STOREBAKKEN, 1996; CARVALHO et al., 1997), e ainda pode ter propriedades funcionais (ADLER-NISSEN, 1986; KLOMPONG et al., 2009; KOTZAMANIS et al., 2007).

As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos são influenciadas pela especificidade das enzimas proteolíticas utilizadas, pela natureza química e física das proteínas intactas (composição e sequência de aminoácidos e comprimento dos peptídeos) e pelas condições de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986; KLOMPONG et al., 2009; KOTZAMANIS et al., 2007; KRISTINSSON; RASCO, 2000). Pesquisas têm descrito diferentes atividades fisiológicas e metabólicas após ensaios, *in vivo* e *in vitro*, com proteínas e peptídeos bioativos purificados derivados de HPP, sendo registrados efeitos antioxidantes (BOUGATEF et al.,

2010; CHUESIANG; SANGUANDEEKUL, 2015; FONSECA et al., 2016; GARCÍA-MORENO et al., 2014; JEMIL et al., 2014; SABEENA-FARVIN et al., 2014), antimicrobianos (ENNAAS et al., 2015; ROBERT et al., 2015; SAFARI et al., 2012; WALD et al., 2016), aumento da atividade das enzimas digestivas dos peixes (KOTZAMANIS et al., 2007; SRICHANUN et al., 2014); efeito prebiótico (HA et al., 2018; SAFARI et al., 2012), melhora na morfometria intestinal (WOSNIAK et al., 2016) e melhora da resposta imune (AHN et al., 2014; BUI et al., 2014; GISBERT et al., 2018; KHOSRAVI et al., 2015; SWANEPOEL; GOOSEN, 2018; TANG et al., 2008).

1.2.2.1 *Produção e Caracterização dos HPP*

A proteína do pescado possui um alto valor biológico, apresentando um perfil de aminoácidos balanceado e alta sensibilidade à hidrólise proteolítica, sendo completamente digestível (MACKIE, 1982; OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999). A preparação dos HPP pode ser realizada a partir de uma grande variedade de espécies e de resíduos provenientes das indústrias de processamento do pescado (BATISTA, 2011). Os componentes principais do pescado que derivam o HPP são músculo, pele, cabeça, barbatanas, vísceras, ovas (HALIM et al., 2016). Existem vários estudos que utilizaram resíduos para a produção de HPP, como, músculo de sardinha (BROGGI et al., 2017; FABREGAT et al., 2016; HA et al., 2018; VIEIRA et al., 2017) e de esturjão chinês (*Acipenser sinensis*); vísceras e músculo de sardinha (VENTURIN et al., 2016; WOSNIAK et al., 2016); cabeça, corpo e vísceras de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (ROBERT et al., 2015) e vísceras de truta arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) (WALD et al., 2016).

Além da matéria-prima, as condições de hidrólise também compreendem parâmetros importantes que afetam as características dos hidrolisados (SRICHANUN et al., 2014). Há um intervalo efetivo para essas condições utilizando diferentes tipos de enzimas, como a variação da quantidade de enzimas de 0,01 a 5,00% (% de enzima a partir da quantidade de proteína na amostra) (KRISTINSSON; RASCO, 2000); da temperatura de 35 a 60°C; do pH entre 1,5 e 11 e do tempo de 10 a 1440 minutos (HALIM et al., 2016). Na hidrólise enzimática são utilizadas enzimas endógenas ou exógenas, e esta última, podem ser derivadas de plantas, animais ou microrganismos (HSU, 2010). As endopeptidases aceleram a quebra de ligações peptídicas no meio das cadeias proteicas, dando origem a peptídeos com maior atividade funcional e poucos aminoácidos livres (BATISTA, 2011). Exopeptidases são as proteases que catalisam a hidrólise de ligações nas extremidades das cadeias polipeptídicas, e produzem muitos aminoácidos livres

e poucos peptídeos (BATISTA, 2011; HSU et al., 2009). Os produtos comerciais mais utilizados são complexos enzimáticos que misturam endo e exopeptidases, como é o caso da Protamex® produzidas a partir de *Bacillus* sp. (LIASET et al., 2002).

Após a produção dos hidrolisados, é importante a caracterização dos mesmos. O grau de hidrólise (GH) é um parâmetro utilizado para a caracterização de hidrolisados proteicos (ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). Pode ser expresso como a porcentagem de ligações peptídicas quebradas em relação à proteína original (ADLER-NISSEN, 1986; LAHL; BRAUN, 1994; MAHMOUD; MALONE; CORDLE, 1992; ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). A ação proteolítica no processo de hidrólise é acelerada pela adição de enzimas à matéria-prima, com controle do pH, temperatura e tempo (FURLAN; OETTERER, 2002), disponibilizando os aminoácidos livres e levando a maior solubilização do nitrogênio (VIDOTTI; VIEGAS; CARNEIRO, 2003), e este pode ser utilizado para produção de meios de cultura para crescimento microbiano (GUERARD et al., 2001).

O peso molecular das frações peptídicas é um importante fator na produção de hidrolisados com propriedades funcionais desejáveis (JEON; BYUN; KIM, 1999; ZAMORA-SILLERO; GHARSALLAOUI; PRENTICE, 2018). E a separação de frações peptídicas por faixas de pesos moleculares e purificação são formas de caracterização dos hidrolisados. Alguns dos processos utilizados para o fracionamento e caracterização dos HPP são a ultrafiltração, filtração em gel, cromatografia de troca iônica e cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa (ISHAK, 2018).

1.2.2.2 Perfil de peptídeos

Os peptídeos bioativos são componentes derivados de alimentos que, em adição ao seu valor nutricional, possuem efeitos fisiológicos que podem exercer uma atividade de regulação no organismo, independente das suas funções nutritivas (VERMEIRSEN; CAMP; VERSTRATE, 2007). Dados de tamanho e porcentagem de peptídeos presentes em diferentes HPP estão apresentados no Quadro 1. Bakke et al. (2010) descreveram a quantidade de aminoácidos presentes nas diferentes faixas de massa molecular. Segundo esses autores, a faixa de massa molecular de 5.000 a 10.000 Da contém 50 a 100 aminoácidos, 1.000 a 5.000 contém 10 a 50 aminoácidos e 100 a 1.000 Da contém 1 a 10 aminoácidos.

Alguns trabalhos têm descrito o perfil de peptídeos de HPP, para em seguida estudar os peptídeos purificados, e descobrir em que faixas de massa molecular apresentam-se os efeitos

biológicos. Dentro das frações solúveis de um hidrolisado de tilápia, 46,9% é composta por polipeptídeos (>2.000), 35,8% por oligopeptídeos (500-2.000 Da) e somente 17,3% de di e tripeptídeos e aminoácidos livres (<500 Da) (ROBERT et al., 2015). Esses autores afirmam que a distribuição de peptídeos confere com o baixo grau de hidrólise, onde as proteínas são pouco ou nada hidrolisadas. O hidrolisado proteico de tilápia apresentou alta porcentagem de peptídeos com massa molecular acima de 2.000 Da (ROBERT et al., 2015). Esta faixa de massa molecular pode apresentar peptídeos bioativos, como os antibacterianos, cujo massa molecular pode variar de 600 a 5.000 Da (WANG; WANG, 2004). Os peptídeos derivados do hidrolisado proteico de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) com massa molecular entre 500 e 3.000 Da, estimularam o sistema de defesa não específico e a produção de ânions de superóxido no salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (BØGWALD et al., 1996; GILDBERG; JOHANSEN; BØGWALD, 1996).

A presença de peptídeos de baixa massa molecular tem demonstrado ter efeito tanto no crescimento como nas propriedades funcionais em diversos trabalhos. Zheng et al. (2013) estudaram o hidrolisado proteico de polaca (*Theragra chalcogramma*) que continha 66% de peptídeos com massa molecular abaixo de 1000 Da e afirmaram que a presença dessa faixa de massa molecular promoveu o aumento do crescimento e a retenção de proteína corporal em juvenis de olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Foi estudado o efeito da inclusão de hidrolisado de salmão (bruto, retido e nanofiltrado) em dietas para bacalhau do Atlântico e concluiu-se que a presença de peptídeos com peso molecular de 100 a 1.000 Da estimulou a síntese de canais PEPT1 ao longo do intestino, o que contribui para melhor absorção da fração proteica (BAKKE et al., 2010). Juvenis de olive flounder foram alimentados com dietas suplementadas com os hidrolisados de krill (*Euphausia superba*) e de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) que continham, em média, 66% de peptídeos menores do que 500 Da, e obtiveram aumento da atividade enzimática da superóxido dismutase (KHOSRAVI et al., 2015). Neste mesmo trabalho, o hidrolisado de krill promoveu aumento no crescimento e melhora na eficiência alimentar.

Estudos *in vitro* também vêm sendo realizados com o intuito de comprovar os efeitos biológicos causados pelos peptídeos bioativos dos HPP. Nalinanon et al. (2011) encontraram peptídeos antioxidantes comumente provenientes de pescados com massas moleculares entre 500 e 1500 Da. Batista et al. (2010) realizaram estudos *in vitro* com o hidrolisado produzido a partir de subprodutos de peixe-espada preto (*Aphanopus carbo*), incluindo cabeça, vísceras e pele, que apresentaram atividade antioxidante. No mesmo estudo, houve a presença de elevada proporção de peptídeos com massas moleculares inferiores a 1.000 Da, o que sugere que eles

podem exibir atividades biológicas, as quais devem ser estudadas. Jiang et al. (2014), purificaram os peptídeos do hidrolisado de músculo de round scad (*Decapterus maruadsi*), os identificaram como His-Asp-His-Pro-Val-Cys (706,8 Da) e His-Glu-Lys-Val-Cys (614,7 Da) e os sintetizaram, sendo comprovada a presença de atividade antioxidante nos dois peptídeos isolados (JIANG et al., 2014).

1.2.2.3 Efeitos *in vitro* e *in vivo* dos HPP

Dietas com diferentes níveis de inclusão e tipos de HPP promoveram melhor desempenho zootécnico e utilização de alimento em diversas espécies de peixes. Tais benefícios foram encontrados quando foi realizada a inclusão de 2 a 10% de hidrolisado proteico de sardinha (*Sardinella* spp.) para o jundiá (*Rhamdia quelen*) (HA et al., 2018); 5 e 10% de hidrolisado proteico de pollock (*Theragra chalcogramma*) para o large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) (TANG et al., 2008); 4% de hidrolisado de krill do Antártico (*Euphausia superba*) para o olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (KHOSRAVI et al., 2015); 4% de hidrolisado de krill e 4,8% de hidrolisado de camarão (*Litopenaeus vannamei*) para o red seabream (*Pagrus major*) (BUI et al., 2014); 3,7% de hidrolisado de pollock (*Theragra chalcogramma*) para o olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (ZHENG et al., 2012); 15% de hidrolisado de pollock (*Pollachius virens*) para o robalo japonês (*Lateolabrax japonicus*) (LIANG et al., 2006). Uma das causas para esses efeitos positivos do HPP sobre os peixes são que a alta palatabilidade pode estimular as enzimas digestivas e canalizar mais produção de biomassa (AGUILA et al., 2007; CAHU et al., 1999; OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999) e pela presença de peptídeos de baixa massa molecular que possuem propriedades bioativas (AKSNES et al., 2006; ZHENG et al., 2013).

Em alguns estudos realizados com a utilização de HPP na alimentação de peixes não houve melhora no desempenho zootécnico. Wilson; Freeman; Poe (1984) utilizaram o HPP na alimentação do catfish (*Ictalurus punctatus*) que resultou em menor eficácia do que a farinha de peixe, devido à deficiência de importantes aminoácidos. A substituição parcial da farinha de peixe por HPP (inclusão de 5, 15 e 25%) não afetou o crescimento de juvenis de pregado (*Scophthalmus maximus*) (OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999) e juvenis de bagre africano (*Clarias gariepinus*) (SWANEPOEL; GOOSEEN, 2018). Para carpa (*Cyprinus carpio*) também não foram observados resultados positivos com a utilização de hidrolisado proteico de peixe para ganho de peso quando comparados com dietas à base de levedura de cana e hidrolisado de caseína (CARVALHO et al., 1997). Alguns dos motivos para ausência de

efeitos positivos após inclusão de HPP pode ser devido a desbalanço de aminoácidos, nível de inclusão inadequado, perfil de peptídeos, sabor amargo do hidrolisado.

O nível inclusão de hidrolisado nas dietas varia bastante, pois tratam-se de produtos e espécies distintas. Em geral, os níveis mais indicados estão entre 2 a 15% de inclusão de HPP (HA et al., 2018; LIANG et al., 2006; REFSTIE; OLLI; STANDALL, 2004; SILVA et al., 2014; ZHENG et al., 2012) com melhores resultados de desempenho e utilização de alimento. Estudos realizados com a inclusão de níveis acima de 25% não obtiveram melhoras sobre o crescimento (LIANG et al., 2006; OLIVA-TELES; CERQUEIRA; GONÇALVES, 1999).

O tipo de matéria-prima do HPP é outro fator que pode interferir nos resultados obtidos. O hidrolisado de krill (*Euphausia superba*) melhorou o desempenho zootécnico, a utilização de alimento e a imunidade inata do olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), quando comparados com os hidrolisados de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e de tilápia (KHOSRAVI et al., 2014, 2015). Para o red seabream (*Pagrus major*) o hidrolisado de krill e o hidrolisado de camarão (*Litopenaeus vannamei*) obtiveram melhores resultados de crescimento, utilização de ração e digestibilidade da proteína em relação ao hidrolisado de tilápia (BUI et al., 2014). Garcia-Moreno et al. (2014), avaliaram hidrolisados de sardinha (*Sardina pilchardus*), horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*), axillary seabream (*Pagellus acarne*), bogue (*Boops boops*) e small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) e concluíram que a sardinha é a espécie com maior potencial de atividade antioxidante. Além do tipo de matéria-prima, outros estudos avaliaram a qualidade dos HPP e seus efeitos sobre o desempenho dos animais (AKSNES et al., 2006; WOSNIAK et al., 2016; ZHENG et al., 2012). Já foi comprovado que a remoção da fração que contém os peptídeos de baixo peso molecular presentes no HPP reduziu o crescimento e a eficiência alimentar de juvenis de truta arco-íris (AKSNES et al., 2006).

Diversos estudos foram realizados para produção de HPP relacionando o grau de hidrólise com o tipo de enzima, fonte de matéria-prima, pH e/ou tempo de hidrólise (CINQ-MARS; LI-CHAN, 2007; NORMAH et al., 2005; SILVA et al., 2014; WALD et al., 2016). Wosniak et al. (2016) concluíram que o fornecimento combinado das duas frações (solúvel e insolúvel) do hidrolisado de sardinha e os GH maiores melhoraram o crescimento e a utilização de alimentar de jundiás. Em outro estudo, Silva et al. (2014) afirmaram que vísceras de tilápia hidrolisadas com enzimas endógenas da mesma espécie obteve GH de 42% e apresentou potencial para aplicações na produção aquícola. Efeito antibacteriano contra contaminantes alimentares e patógenos da piscicultura foi encontrado com o uso do hidrolisado de truta arco-íris com GH de 30%, 37°C e pH 3,0 (WALD et al., 2016).

Estudos relacionados com a saúde dos peixes também tem sido realizado. Efeitos sobre o sistema imunológico foram encontrados por Hermannsdottir et al. (2009), que observaram aumento da produção de lisozima e C3 em larvas de halibut do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus* L.) alimentadas com dietas enriquecidas com HPP. Gisbert et al. (2018), concluiu que a inclusão do hidrolisado de camarão melhorou a imunidade humoral inespecífica de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), proporcionando maior proteção contra *Vibrio pelagius*. No entanto, Murray et al. (2003), não encontraram qualquer efeito positivo do hidrolisado de proteína na dieta sobre as funções imunológicas inatas do juvenil de salmão prateado.

Quadro 1. Perfil de peptídeos provenientes de hidrolisados proteicos de pescado

Tipos de hidrolisados	Distribuição de Massa Molecular (% de peptídeos)									Referências
	0–100 Da	100–500 Da	500–1000 Da	1000–2000 Da	2000–5000 Da	5000–10000 Da	10000–20000 Da	20000–30000 Da	>30000 Da	
Camarão (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	68		18	12		<0,1	<0,1	<0,1	2	Bui et al. (2014); Khosravi et al. (2014)
Camarão	78,4		10,1	10,3		1,0	0,2	0		Gisbert et al., 2018
Krill (<i>Euphausia superba</i>)	64		16	18		2	<0,1	<0,1	<0,1	Bui et al. (2014); Khosravi et al. (2014)
Krill (<i>Euphausia superba</i>)	64		16	17,7		2	0,3	<0,1	<0,1	Khosravi et al. (2015)
Pollock (<i>Theragra chalcogramma</i>)	26,5		66,4	5,5		1,6	<0,1	<0,1		Zheng et al. (2013)
Pollock (<i>T. chalcogramma</i>)	40,58		24,45	34,86		<1				Cai et al. (2015)
Pollock ultrafiltrado permeado	74,41		22,01	3,26		<1				Cai et al. (2015)
Pollock retido após ultrafiltração	23,61		30,51	45,53		<1				Cai et al. (2015)
Salmão (<i>Salmo salar</i>)	16		36,1	9,7		35,9		<1		Aksnes et al. (2006); Bakke et al. (2010)
Salmão retido após ultrafiltração	10,6		32,2	11,5		42,6		<1		Aksnes et al. (2006)
Salmão permeado após ultrafiltração	33,4		48,1	8,3		10,1		<1		Aksnes et al. (2006)
<i>Sardinella</i> spp.	2,64		0,4	10,6		39,2	0,3	15,5	31,1	Ha et al. (2018)
Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	52		18	27		2	1	<0,1	<0,1	Bui et al. (2014); Khosravi et al. (2014)
Tilápia	17,30		11,20	24,60	34,70	12,20				Robert et al. (2015)
Atum	66,5		4,3	10,5		9,6	8,2	0,9	<0,1	Khosravi et al. (2015)

1.2.3 Modelos Biológicos

1.2.3.1 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O gênero *Rhamdia* é formado por 11 espécies, dentre as quais o *Rhamdia quelen* que possui 49 sinônimas. Esse siluriforme apresenta distribuição neotropical, sendo encontrado desde o sudeste do México até o centro da Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Este peixe apresenta hábito alimentar onívoro no ambiente natural, tendo preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GOMES et al., 2000). Esta característica contribui para a adaptação deste peixe ao alimento artificial, facilitando a sua adaptação às condições de cultivo (CARNEIRO; MIKOS, 2005).

O jundiá é uma espécie que tem despertado interesse de pesquisadores e piscicultores, principalmente da região Sul do Brasil, devido a sua boa taxa de crescimento, facilidade de reprodução e larvicultura, carne saborosa e ausência de espinhas intramusculares, tendo grande aceitação pelos consumidores, além da boa adaptação ao clima (GOMES et al., 2000). Apesar de já existirem alguns estudos relacionados à produção de jundiá (BALDISSEROTO; RADÜNZ, 2004; PEDRON et al., 2011; VARGAS et al., 2013; WOSNIAK et al., 2016), devido à grande importância comercial desse teleósteo, conhecido como bagre sul americano, ainda existe uma grande demanda por informações, principalmente em relação à sua nutrição e saúde. Trata-se também de um bom modelo experimental para estudos de nutrição, pois a morfologia do trato gastrointestinal assemelha-se a do catfish (*Ictalurus punctatus*), espécie muito estudada internacionalmente, que inclusive são utilizadas dietas com composição nutricional semelhante para ambas às espécies (MEYER; FRACALOSSO, 2004).

1.2.3.3 Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia é oriunda da África, Israel e Jordânia (VERANI, 1980) e foi introduzida no Brasil em 1971 (CASTAGNOLLI, 1992). É um ciclídeo de água doce e apresenta hábito alimentar onívoro (DEGANI; REVACH, 1991). Dentre as espécies pertencentes a esse grupo, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das 22 que se destacam comercialmente (EL-SAYED, 2006). Apresenta características desejáveis como rápido crescimento e rusticidade, resistência à altas densidades, adapta-se a diferentes sistemas de manejo (CASTAGNOLLI, 1992) e é uma das espécies mais cultivada no mundo (FAO, 2018).

A produção mundial de tilápia-do-Nilo atingiu cerca de 4,2 milhões de toneladas, o que representou 8% do total de peixes produzidos em 2016 (FAO, 2018). No Brasil, a tilápia é também uma das espécies mais produzidas, sendo predominante, nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (EMBRAPA, 2016). Devido ao seu potencial para aquicultura, são estudados muitos aspectos da nutrição desta espécie (DEGANI; REVACH, 1991).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-NISSEN, J. Enzyme hydrolysis of food proteins. England: Elsevier **Applied Science Publishers**, 1986. 427 p.
- AGUILA, J.; CUZON, G.; PASCUAL, C.; DOMINGUES, P. M.; GAXIOLAC, G.; SÁNCHEZ, C. A.; MALDONADO, E. T.; ROSAS, C. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. **Aquaculture**, v. 273, p. 641-655, 2007.
- AHN, C. B.; KIM, J. G.; JE, J. Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 147, p. 78-83, 2014.
- AKSNES, A.; HOPE, B.; JÖNSSON, E.; BJÖRNSSON, B. T.; ALBREKTSEN, 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.
- ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- ASPEVIK, T.; TOTLAND, C.; LEA, P.; OTERHALS, Å. Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1006-1014, 2016.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carcinicultura. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 1, p. 91-100, 2008.
- 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.
- BALDISSEROTO, B.; RADUNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Editora UFSM, 2004. 232 p.
- BATISTA, I.; RAMOS, C.; MENDONÇA, R.; NUNES, M. L. Enzymatic hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products and lipid recovery. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 18, p. 12-134, 2009.
- BATISTA, I.; RAMOS, C.; COUTINHO, J.; BANDARRA, N. M.; NUNES, M. L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 18-24, 2010.
- BATISTA, I. **Hidrolisados proteicos de pescado**. In: GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 386-398.
- BERGE, G. M.; STOREBAKKEN, T. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. **Aquaculture**, v. 145, p. 205-212. 1996.

- BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. **Bioresource technology**, v. 98, p. 388-394, 2007.
- BØGWALD, J.; DALMO, R.; LEIFSON, R. M.; STENBERN, E.; GILDBERG, A. The stimulatory effect of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 6, p. 3-16, 1996.
- BORGHESI, R.; ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. Fatty acid composition of acid, biological and enzymatic fish silage. **Boletim CEPPA**, v. 26, p. 205-212, 2008.
- BOUGATEF, A.; NEDJAR-ARROUME, N.; MANNI, L.; RAVALLEC, R.; BARKIA, A.; GUILLOCHON, D.; NASRI, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chem.**, v. 118, p. 559–565, 2010. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.021
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília: [s.n.], 2013.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 69, n. 2, p. 505-512, 2017.
- 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**, v. 418-419, p.11-16, 2014.
- CAHU, C. L.; ZAMBONINO INFANTE, J. L.; QUAZUGUEL, P.; LE GALL, M. M. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. **Aquaculture**, v. 171, p. 109–119, 1999.
- CAI, Z.; LI, W.; MAI, K.; Xu, W.; ZHANG, Y.; AI, Q. Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. **Aquaculture**, v. 440, p. 40–47, 2015.
- CARNEIRO, P. C. F.; MIKOS, J. D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 187-191, 2005.
- CARVALHO, A. P.; ESCAFRE, A. M.; OLIVA TELES, A.; BERGOT, P. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. **Aquaculture International**, v. 5, p. 361-367, 1997.
- CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep, 1992.
- 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.

- CHUESIANG, P.; SANGUANDEEKUL, R. Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitor properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1436–1444, 2015.
- CINQ-MARS, C. D.; LI-CHAN, E. C. Y. Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9380–9388, 2007.
- 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.
- DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* X *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel 1822). **Aquaculture Fish Management**, v. 22, p. 397-403, 1991.
- DRAGNES, B. T.; STORMO, S. K.; LARSEN, R.; ERNSTSEN, H. H.; ELVEVOLL, E. O. Utilisation of fish industry residuals: Screening the taurine concentration and angiotensin converting enzyme inhibition potential in cod and salmon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 714-717, 2009.
- EL-SAYED, A. F. M. **Tilapia Culture**. CABI Publishing, Massachusetts, USA, 2006.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Mercado da Tilápia – 2o trimestre de 2016. Palmas: Embrapa, 2016. (Informativo Mercado da Tilápia, n. 8). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1051014/o-mercado-da-tilapia---2-trimestre-de-2016>>.
- 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.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 6, p. 1713-1720, 2016.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2008 (SOFIA)**. Roma: FAO, 2009. 196 p.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma: FAO, 2018. 227 p.
- 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. **Int. Food Res. J.**, v. 23, p. 152–160, 2016.
- FURLAN, E. F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

- GARCÍA-MORENO, P.J., BATISTA, I., PIRES, C., BANDARRA, N.M., ESPEJO-CARPIO, F.J., GUADIX, A., GUADIZ, E.M., Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Food Res Int**, v. 65, p. 469-476, 2014.
- GHALY, A. E.; RAMAKRISHNAN, V. V.; BROOK, M. S.; BUDGE, S. M.; DAVE, D. Fish processing wastes as a potential source of proteins, amino acids and oils: a critical review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 5, n. 4, p. 107-129, 2013.
- GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; BØGWALD, J. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas almonicida*. **Aquaculture**, v. 138, p. 23-34, 1996.
- 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.
- GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, p. 179-185, 2000.
- GUERARD, F.; DUFFOSSE, L.; DE LA BROISE, D.; BINET, A. Enzymatic hydrolysis of roteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) wastes using alcalase. **J. Molec. Catalysis, B, Enzymatic**, v. 11, p. 1051-1059, 2001.
- HA, N.; JESUS, G. F. A.; GONÇALVES, A. F. N.; OLIVEIRA, N. S.; SUGAI, J. K.; PESSATTI, M. L.; MOURIÑO, J. L. P.; 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, 2018.
- HALIM, N. R. A.; YUSOF, H. M.; SARBON, N. M. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 24-33, 2016.
- 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. 595-602, 2009.
- HSU, K. C.; LU, G. H.; JAO, C. L. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 647-652, 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.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório Pesqueiro, 2011**. Brasília, Brasil, 2011.
- JEMIL, I.; JRIDIA, M.; NASRIA, R.; KTARIA, N.; SALEM, R. B. S. B.; MEHIRI, M.; HAJJIA, M.; NASRI, M. Functional, antioxidant and antibacterial properties of

proteinhydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 963-972, 2014.

JEON, Y. J.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**, v. 35 p. 471-478, 1999.

JIANG, H.; TONG, T.; SUN, J.; XU, Y.; ZHAO, Z.; LIAO, D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. **Food Chemistry**, v. 154, p. 158–163, 2014.

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. Doi: 10.1111/anu.12157.

KHOSRAVI, S.; BUI, H. T. D.; RAHIMNEJAD, S.; HERAULT, M.; FOURNIER, V.; KIM, S. S.; JEONG, J. B.; LEE, K. J. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 435, p. 371-376, 2015.

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*). **J. Food Sci.**, v. 74, p. C126–C133, 2009.

KOTZAMANIS, Y. P.; GISBERT, E.; GATESOUPÉ, 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.**, Part A, v. 147, p. 205–214, 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.

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.

LEAL, A. L. G.; CASTRO, P. F.; LIMA, J. P. V.; CORREIA, E. S.; BEZERRA, R. S. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. **Aquaculture International**, v. 18, p. 635–646, 2009.

LIANG, M.; WANG, J.; CHANG, Q.; MAI, K. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). **Aquaculture Research**, v.37, p.102-106, 2006.

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**, 37, 1263–1269, 2002.

MACKIE, L. M. Fish protein hydrolysate. **Process Biochem**, v. 17, p. 26-28, 1982.

- MAHMOUD, M. I.; MALONE, W. T.; CORDLE, C. T. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. **J. Food Sci.**, Chicago, v.57, p.1223-1229, 1992.
- MARTONE, C. B.; BORLA, O. P.; SANCHEZ, J. J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 383-387, 2005.
- MEYER, G.; FRACALOSS, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p. 331-343, 2004.
- MURRAY, A. L.; PONALD, J. P.; ALCORN, S. W.; FAIRGRIEVE, W. T.; SHEARER, K. D.; ROLEY, D. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 220, p. 643-653, 2003.
- NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; SHAHIDI, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1354-1362, 2011.
- NOLASCO, A. M. **Resíduos da colheita e beneficiamento da caixeta – *Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C.: Caracterização e perspectivas**. 2000. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, 2000.
- NORMAH, I.; JAMILAH, B.; SAARI, N.; YAAKOB, B. C. Optimization of hydrolysis conditions for the production of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase. **Journal of Muscle Foods**, v. 16, p. 87–102, 2005.
- 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, 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 & Technology**, v. 36, p. 144-151, 2014.
- OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2002. 200 p.
- PEDRON, F. A.; RANDÜNZ NETO, J.; SILVA, L. P.; BERGAMIN, G. T.; MASCHIO, D.; MARTINELLI, S. G.; DELLAFLORA, M. A.; CORRÊA, V. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) com diferentes proporções de amilose: amilopectina na dieta. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, p. 1200-1207, 2011.
- 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, GILDAS; BERNAY, B.; HENRY, J. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-products hydrolysate and *in vitro* evaluation of antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 487–492, 2015.
- SABEENA-FARVIN, K. H.; ANDERSEN, L. L.; NIELSEN, H. H.; JACOBSEN, C.; JAKOBSEN, G.; JOHANSSON, I.; JESSEN, F. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*)

protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 149, p. 326-334, 2014.

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.

SHAHIDI, F.; BOTTA, J. R. (Eds.), **Seafoods: chemistry, processing technology, and quality**. Blackie Academic and Professional, London, U.K, 1994. p. 321–334.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A Systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. Tese (Doutorado - Department of Vertebrate Zoology), Swedish Museum Natural History, Stockholm, Sweden.

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.

SOCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Seafood as functional food. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 443-454, 2003.

SRICHANUN, M.; TANTIKITTI, C.; KORTNER, T. M.; KROGDAHL, A.; CHOTIKACHINDA, R. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. **Aquaculture**, v. 428-429, p. 195-202, 2014.

SWANEPOEL, J. C.; GOOSEN, N. J. Evaluation of fish protein hydrolysates in juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*) diets. **Aquaculture**, v. 496, p. 262–269, 2018.

TANG, H.; WU, T.; ZHAO, Z.; PAN, X. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). **J. Zhejiang Univ. Sci., Part B**, v. 9, p. 684–690, 2008.

UNIVALI/CTTMar. **Boletim estatístico da pesca industrial de Santa Catarina - Ano 2012**. Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, Itajaí, SC, 2013. 76 p.

VARGAS, R. J.; DOTTA, G.; MOURIÑO, J. L.; SILVA, B. C.; FRACALOSSO, D. M. Dietary lipid sources affect freshwater catfish jundiá, *Rhamdia quelen*, survival, when challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 349-355, 2013.

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. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 42, n. 4, p. 878-888, 2016

VERANI, J. R. Controle populacional em cultivo intensivo consorciado entre tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1757) e o tucunaré comum, *Cichla ocellaris* (SCHNEIDER, 1801) – Aspectos quantitativos. **Dissertação** (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Departamento de Ciências Biológicas. UFSCar. São Carlos, 1980. 116 p.

- VERMEIRSEN, V.; CAMP, J. V.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 92, p. 357-366, 2007.
- VIDOTTI, R. M.; VIEGAS, E. M. M.; CARNEIRO, D. J. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. **Animal Feed Science and Technology**, v. 105, p. 199-204, 2003.
- VIEIRA, S. F. R. J.; BERRI, A. N.; MENEZES, C. S. M.; BESEN, K. P.; PESSATTI, M. L.; FABREGAT, T. E. H. P. Escolha do hidrolisado de sardinha como atrativo alimentar pelo jundiá. **B. Inst. Pesca**, v. 43, n. 1, p. 98 - 105, 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.
- WANG, Z.; WANG, G. APD: the antimicrobial peptide database. **Nucleic Acids Res**, v. 32; p. D590–2, 2004.
- WILSON, R. P.; FREEMAN, D. W.; POE, W. E. Three types of catfish offal meals for channel catfish fingerlings. **Prog.Fish Cult.**, v. 46, p. 126-132, 1984.
- WISNIEWISKI JUNIOR, A.; WIGGERS, V. R.; SIMIONATTO, E. L.; MEIER, H. F.; BARROS, A. A. C.; MADUREIRA, L. A. S. Biofuels from waste pyrolysis: chemical composition. **Fuel**, Guildford, v. 89, p. 563-568, 2010.
- 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.
- ZAMORA-SILLERO, J.; GHARSALLAOUI, A.; PRENTICE, C. Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. **Marine Biotechnology**, v. 20, p. 118-130, 2018.
- ZHENG, K.; LIANG, M.; YAO, H.; WANG, J.; CHANG, Q. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 297-303, 2012.
- ZHENG, K.; XU, T.; QIAN, C.; LIANG, M.; WANG, X. Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 20, p. 372-380, 2013.

2 CAPÍTULO 2 – Sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology

Natalia Ha^a, Gabriel Fernandes Alves Jesus^b, André Fernando Nascimento Gonçalves^a, Nandara Soares de Oliveira^a, Juliet Kiyoko Sugai^b, Marcos Luiz Pessatti^c, José Luiz Pedreira Mourinho^b, Thiago El Hadi Perez Fabregat^{a,*}

^a Universidade do Estado de Santa Catarina. UDESC – Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, 88520-000 - ha.natalia@yahoo.com.br*; andre@zootecista.com.br; nandara.soares@hotmail.com; thiagofabregat@hotmail.com

^b Universidade Federal de Santa Catarina. UFSC – Rod. Admar Gonzaga, 1346 - Itacorubi, Florianópolis, SC, 88034-000 – gabriel_faj@hotmail.com; juliet.sugai@ufsc.br; jose.mourino@ufsc.br

^c Universidade do Vale do Itajaí. UNIVALI - R. Uruguai, 458 - Centro, Itajaí, SC, 88302-202 - pessatti@univali.br

***Corresponding authors at:** UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, Avenida Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, Brazil. Zip code 88520-000. thiagofabregat@hotmail.com

Abstract

This study evaluated the effects of dietary inclusion of sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate (SPH) on productive performance, digestive enzymatic activity, morphology and intestinal microbiology of South American catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles. SPH was produced from sardine processing wastes using Protamex® protease complex from Novozymes A/S. Four levels of inclusion were evaluated (0, 2, 5 and 10%). A total of 480 South American catfish juveniles (average weight 11.3 ± 2.46 g) were distributed in 24 polyethylene containers, in a completely randomized design with four treatments and six replications. The fish were fed twice daily until apparent satiation with isoproteic (39%) and isoenergetic (4376 kcal. kg⁻¹) diets for 56 days. Regardless of the SPH inclusion levels in the diets, average weight gains (36.28 g), specific growth rate (2.56% day⁻¹), apparent feed intake (40.51 g) and apparent feed conversion rate (1.12) were improved when compared to the control treatment (average of 24.95 g; 2.11% day⁻¹; 31.00 g and 1.28, respectively). Total alkaline protease activity of the

gastrointestinal tract of the South American catfish juveniles was higher in the treatment that received 5% SPH (0.61 ± 0.23 U. mg^{-1} of protein) than in the control (0.26 ± 0.08 U. mg^{-1} of protein). The amylase activity was higher in the treatments with 2% SPH (1.58 ± 0.19 U. mg^{-1} of protein) and 5% SPH (1.43 ± 0.44 U. mg^{-1} of protein) when compared to the control (0.40 ± 0.18 U. mg^{-1} of protein). In the 5% SPH treatment, higher amounts of lactic acid bacteria and *Vibrionaceae* were detected than in the other treatments. No difference was found for total heterotrophic bacteria. There was no difference in the intestinal morphometry of the South American catfish for any one of the analyzed parameters. Inclusion levels of up to 10% SPH in the diets of South American catfish showed improvement in the productive performance and nutritional efficiency, acting as a growth promoter. The inclusion level of 5% SPH caused an increase in the digestive enzymatic activity and populations of intestinal lactic acid bacteria. Thus, a prebiotic effect on the fishes was observed and the inclusion level may determine the effects of SPH.

Keywords: Prebiotic effect, Digestive enzymes, Enzymatic hydrolysis, Biologically-active peptides, Growth promoter, Fish by-products

2.1 Introduction

The total global catch production of ocean fishes reached 81.5 million tons in 2014, with *Sardinella* spp. as one of the most caught species (FAO, 2016). Residues generated from fish processing are approximately 50% of the total catch (Bechtel, 2003). As a result, recycling such wastes has become of interest for alternative uses. The development of by-products increases profit and sustainability for the catch production of fish. The by-products of fish processing can provide high quality nutrients to meet the animal protein requirements in fish feeds. Fish protein hydrolysate (FPH) results from the enzymatic hydrolysis of processed fish wastes and is rich in free amino acids and in low molecular weight peptides (Liaset et al., 2000).

The benefits of incorporating fish hydrolysates in diets are due to the enzymatic treatment, which facilitates the absorption of the molecules by the intestinal epithelial cells (Bakke et al., 2010). Di- and tri-peptides may also improve palatability (Aguila et al., 2007; Oliva-Teles et al., 1999), disease resistance in fish and survival (Kotzamanis et al., 2007). They also enhance the nutritional properties to stimulate the feed consumption, increase intake of nutrients and enhance growth, as observed with the Atlantic salmon *Salmo salar* (Berge and Storebakken, 1996), cobia *Rachycentron canadum* (Costa-Bomfim et al., 2016), large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Tang et al., 2008), olive flounder *Paralichthys olivaceus*

(Khosravi et al., 2014), red seabream (*Pagrus major*) (Bui et al., 2014) and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Aksnes et al., 2006).

Previous studies that sought to develop novel feeds have suggested that FPH holds several benefits for fish through the formation of biologically-active peptides resulted from enzymatic hydrolysis (Bøgwald et al., 1996, Kotzamanis et al., 2007), which includes antioxidant (García-Moreno et al., 2014; Jemil et al., 2014; Sabeena-Farvin et al., 2014) and antimicrobial (Safari et al., 2012; Wald et al., 2016) properties, increased digestive enzymatic activity (Kotzamanis et al., 2007; Srichanun et al., 2014) and improved immune responses in fish (Bui et al., 2014; Khosravi et al., 2015; Tang et al., 2008). Protein hydrolysates may also have a prebiotic effect in the digestive tract (Arihara, 2006), which was affirmed by the proliferation of the bacteria *Lactobacillus* sp. in *in vitro* experiments (Safari et al., 2012). Preliminary results have shown the positive effects of sardine protein hydrolysate on the intestinal morphometry of South American catfish (*Rhamdia quelen*) (Wosniak et al., 2016), but further *in vivo* studies are necessary to describe the effects on the intestinal microbiology.

The bioactive amino acids and peptides composition of the FPH depends on the raw material source, the enzyme and the hydrolysis conditions (Klompong et al., 2009; Kotzamanis et al., 2007). To obtain positive responses in fish production, sufficient inclusion levels of FPH should be established (Espe et al., 1992). The South American catfish (*Rhamdia quelen*) is an omnivorous species found from Argentina to Mexico (Fishbase, 2017). This species is targeted for commercial fisheries due to its resistance to cold weather, high growth rate and carcass yields (Salhi et al., 2004). It is also a good model organism for nutrition studies because the morphology of the gastrointestinal tract is homologous to that of the Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). This study evaluated the inclusion levels of sardine muscle protein hydrolysate (SPH) in diets of South American catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles. Effects of SPH on the growth and health were evaluated through the productive performance, morphometry, microbiology and enzymatic activity of the gastrointestinal tract.

2.2 Materials and Methods

2.2.1. Production and characterization of sardine protein hydrolysate

Sardine protein hydrolysates (SPH) were produced from muscle (free of head, tail and viscera) of sardines (*Sardinella* spp.), obtained from a fish processing facility in Itajaí, in the state of Santa Catarina, Brazil. The samples were homogenized in water at a ratio of 1:0.85 (volume:volume) and incubated with Protamex® Novozymes A/S (1:100 enzyme:fish) at 55°C for 90 minutes, followed by enzyme inactivation at 85 °C for 15 min. The resulting material

was placed in a forced-air oven at 55–60 °C to reduce moisture to 35% and was kept at –20 °C until the time of use.

Chemical analyses were carried out following methods described in AOAC (2000). Moisture content was determined by infrared radiation, and the content of lipids by the Soxhlet method. Protein content was determined according to the Kjeldahl method, and mineral content by incineration in a muffle furnace at 550–600 °C. The degree of hydrolysis (DH%) was determined by using a method modified from Nielsen et al. (2001) (Table 1). The analysis consists of quantifying the proportion of free amino groups in the soluble fraction of the protein hydrolysate via the reaction of these groups with o-phthalaldehyde (OPA), in relation to the total protein in the feedstock. The tests were conducted in transparent bottom microplates by adding 40 µl of the sample and 260 µl of the OPA reagent. Absorbance readings were performed at 340 nm in a Genius (Tecan®) microplate reader and the results were expressed as DH (%) by the equation:

$$\text{DH (\%)} = [(\text{Serine-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv} / \text{g of protein}] / \text{htot} * 100.$$

The α , β and htot values were previously determined for fishes as 1.00, 0.40 and 8.6, respectively (Adler-Nissen, 1986).

Table 1. Composition of the sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate

	GE	GP*	EE*	MM*	DH
	(kcal/ kg)	(%)	(%)	(%)	(%)
Sardine protein hydrolysate	5285.60	72.2	9.20	7.50	47.5

*Values based on dry matter; GE = Gross energy; GP = Gross protein; EE = Ethereal extract; MM = Mineral matter; DH = Degree of hydrolysis.

2.2.1.1 Hydrolysate electrophoresis

For the determination of the molecular weight distribution of the peptides of the hydrolysates, electrophoretic runs were performed in Tricine-SDS-PAGE (Schägger, 2006), in a mini-Protean electrophoresis system (BioRad). BioRad® polypeptide standards (cat.161–0326), between 26,625 and 1423 Da were used as a control marker. The gel was stained with 0.025% Coomassie Blue. Gels were also stained with silver nitrate after Coomassie discoloration according to Schägger (2006), using the Silver Stain Plus kit (BioRad®). To visualize the molecular weight peptides that were less detected by Coomassie Blue, the gels were treated with imidazole-SDS, followed by a zinc stain, according to Fernandez-Patron et

al. (1995). The density of the protein bands was measured using the freeware Gel Analyzer, developed by Istvan Lazar (Table 2).

Table 2. Distribution of peptides in sardine (*Sardinella* spp.) protein hydrolysate

Apparent molecular weight profile of peptides of SPH	Amount (%)	Amount (%) Including Zinc Bands revealed
>100,000 Da	6.3	6.0
50,100–100,000 Da	4.3	4.1
30,100–50,000 Da	20.5	19.3
20,100–30,000 Da	15.5	14.7
10,100–20,000 Da	0.3	0.3
5100–10,000 Da	39.2	37.0
2100–5000 Da	10.6	10.0
1100–2000 Da	0.4	0.4
<1000 Da	2.64	8.07

2.2.2. Experimental diets

The SPH was evaluated at four levels of inclusion (0, 2, 5 and 10%). Diets were isoproteic (39% of crude protein) and isoenergetic (about 4376 kcal of gross energy kg⁻¹), formulated as required for South American catfish (Meyer and Fracalossi, 2004) (Table 3). In addition to the hydrolysate, diets were formulated using fish meal and soybean meal as protein sources, and fish oil and corn meal as energy sources. The marine fishmeal was purchased from Agroforte® (Laguna, Santa Catarina, Brazil) and the other ingredients were acquired from local suppliers. All ingredients were ground in a knife mill with a 2-mm mesh screen, mixed, pelletized with the addition of water (30%) and placed in an oven at 45 °C for 48 h. The diets were stored in plastic containers and placed in refrigerators (4 °C) until the time of use. All ingredients and commercial diets were analyzed according to the methods described in AOAC (2000).

151 **Table 3.** Composition of the experimental diets

	Experimental diets			
(%)	0%	2%	5%	10%
Soybean meal	25.0	25.0	25.0	25.0
Wheat meal	10.0	10.0	10.0	10.0
Corn meal	10.5	12.0	13.5	16.0
Fish meal	46.5	43.5	39.5	33.0
Sardine hydrolysate	–	2.0	5.0	10.0
Fish oil	2.0	1.5	1.0	–
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Premix ¹	1.0	1.0	1.0	1.0
Analyzed composition				
Dry matter (%)	91.21	91.15	91.10	91.01
Crude protein (%)	39.44	39.39	39.52	39.83
Gross energy (kcal kg ⁻¹)	4316.05	4382.67	4395.80	4407.75
Crude lipid (%)	11.64	11.16	10.70	9.79
Crude fiber (%)	3.09	3.13	3.16	3.21
Ash (%)	14.62	13.99	13.16	11.83

152 ¹ Folic acid – 2,400 mg, nicotinic acid – 48 g, pantothenic acid – 24 g, biotin – 96 mg, vit. A – 2,400,000 IU, vit.
153 D3 – 400,000 IU, vit. E – 24,000 IU, vit. B1 – 9,600 mg, vit. B2 – 9,600 mg, vit. B6 – 9,600 mg, vit. B12 – 9,600
154 mg, vit K3 – 4,800 mg, vit. C – 96 g, iron – 100 g, manganese – 40 g, zinc – 6,000 mg, cobalt – 20 mg, iodine –
155 200 mg, selenium – 200 mg, antioxidant – 19.6 g.

156

157 *2.2.3. Animals and facilities*

158 This experiment was approved by the Ethics Committee of the Santa Catarina State
159 University (protocol number CEUA 7119220216). A total of 480 South American catfish
160 juveniles (average weight 11.3 ± 2.5 g) were acquired from a commercial fishery and were
161 acclimated to the experimental conditions for 30 days. At the end of the acclimation period, the
162 fish were distributed into 24 polyethylene containers with a net volume of 70 l, connected to a
163 water recirculation system equipped with a mechanical and biological filter and a UV light. The
164 photoperiod was 12 h of light. Constant temperature was maintained with heaters with
165 thermostats, and the water was oxygenated using an air compressor coupled to silicone hoses
166 and porous stones. The water quality was monitored daily using portable instruments (YSI
167 PROPLUS, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) to determine the

following: dissolved oxygen ($6.77 \pm 0.42 \text{ mg dl}^{-1}$), temperature ($28.82 \pm 0.9 \text{ }^{\circ}\text{C}$), pH (7.24 ± 0.35) and total ammonia (LabconTest, Alcon Pet, Brazil) ($0.19 \pm 0.1 \text{ mg NH}_3 \text{ l}^{-1}$). All parameters were within the limits considered adequate for fish farming (Boyd, 1998). The fish were fed twice daily (9 a.m. and 4 p.m.) with the experimental diets until apparent satiation for 56 days. There was no leftover feed in the tanks after feeding. The organic matter deposited on the bottom of the containers was removed by siphoning with a rubber hose.

2.2.4. Productive performance

At the beginning of the study and at 56 days, all fish received no feed for 24 h and were anesthetized in eugenol solution ($1 \text{ g } 10 \text{ l}^{-1}$ of water), and weighed and measured individually. The productive performance was analyzed as described in Tacon (1990): weight gain (WG, $\text{g} = \text{final mean weight} - \text{initial mean weight}$), apparent feed intake (FI, $\text{g} = \text{food consumed during the experimental period} / \text{number of fish per container}$); apparent feed conversion rate (FCR = $\text{feed intake} / \text{total weight gain}$) and specific growth rate (SGR, $\% \text{ day}^{-1} = [(\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}) / \text{experimental period}] * 100$).

At 56 days, the animals were anesthetized and then euthanized by medullar sectioning to collect the biological materials for the analyses described below.

2.2.5. Enzymatic analyses

Enzymatic analyses of the total alkaline protease and amylase activities of the gastrointestinal tract were carried out with one fish from each container ($n = 6$ fish per treatment). The digestive tract was extracted by making an incision from the stomach to the anus. The tract was weighted (w) and homogenized in chilled distilled water (v) ($1:6, w/v$) using a van Potter homogenizer for 2.5 min (five times for 30 s in ice bath) and centrifuged at $27,167 \times g$ (Eppendorf centrifugal, model 5804 R) for 15 min at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the supernatants were used to determine the activity of the digestive enzymes. The amylase activity in the samples was quantified by starch hydrolysis (E. Merck, Darmstadt, Germany), using methodology developed by Rick and Stegbauer (1974) and described by Aguilar-Quaresma and Sugai (2005). The reaction was stopped with dinitrosalicylic acid reagent and the hydrolysis product was quantified by the reducing sugar method of dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to Miller (1959), using maltose (E. Merck, Darmstadt, Germany) as a standard and read at 540 nm. The total alkaline protease activity was determined by azocasein hydrolysis (Sigma, St. Louis, Mo, USA), using the method described by Garcia-Carreño et al. (1997). The amylase activity was expressed as specific activity $\mu\text{mol reducing sugars. min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of

protein in the extract (U mg^{-1} of protein). The specific activity of the alkaline protease was expressed as the difference in absorbance at 366 nm between the sample and the control $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein in the extract (U mg^{-1} of protein). Soluble protein concentration of supernatant was determined by the Bradford method (Bradford, 1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as the standard. All the assays were analyzed in triplicate.

2.2.6. Microbiological assessments

The digestive tract was sampled from one fish of each tank ($n = 6$ fish per treatment) to evaluate the intestinal microbiota. The intestines were removed, weighted, crushed and homogenized in 0.65% sterile saline solution. Then, the intestines were serially diluted (1:10) in test tubes containing sterile saline solution and transplanted on Petri plates with TCBS (thiosulfate citrate bile sucrose) agar, MRS (Man Rogosa Sharpe) agar and TSA (tryptone soy agar) to quantify the *Vibrionaceae*, lactic acid and total heterotrophic bacteria, respectively. The intestinal homogenates transplanted on Petri plates were incubated in an oven at 35 °C. Total colony-forming units (CFU) were counted 24 h after incubation in the TCBS and TSA media. In the MRS medium, counting was performed 48 h after incubation.

2.2.7. Intestinal morphometry

The histological analysis of the intestines was performed with one fish from each tank ($n = 6$ fish per treatment). Portions of nearly 3 cm in length were collected from the mid intestine, and each sample was fixed in a 10% buffered formalin solution for 24 h, dehydrated in an ascending series of alcohols, diaphanized in xylene, paraffin-embedded and cut in 5- μm sections for preparation of the slides. This sample was then stained according to the Harris-Eosin (HE) staining method. The slides were observed under an optical microscope (OptiCam, 10 $\times$) and photographed using a digital camera (Moticam 2300, 3 MP, resolution 3264 $\times$ 2448). Total villi height, villi height, width and thickness were measured by analyzing 15 villi per fish using the ToupTek ToupView - $\times 64$ image analyzer software, versions 2270/07/03. The height and total height of the villi corresponded to the distance from the apex of the villi to the beginning of the muscular layer and the apex of the villi until the end of the serosa (Mello et al., 2013). The width is of the villi and the thickness is relative to the villi epithelium

2.2.8. Design and statistical analysis

The experiment was carried out in a completely randomized design with four treatments and six replications, and the treatments corresponded to the addition of 0, 2, 5 and 10% of SPH to the diets. Data were subjected to the Cramer-von Mises test for normality and the Levene test to assess homoscedasticity of variances. Percentage values were submitted to arcsine transformation. The results were subjected to the analysis of variance (ANOVA), and the means were compared by the Tukey test using the SAS statistical program, version 9.0.

2.3. Results

At 56 days of the experiment, weight gain, specific growth rate and apparent feed intake were higher ($P < 0.05$) in the treatments that received the SPH diet when compared to the control treatment (Table 4), regardless of the concentrations. The apparent feed conversion rate was lower ($P < 0.05$) in the treatments with SPH when compared to the control. No fish mortality was observed during the experiment.

Table 4. Productive performance of South American catfish juveniles fed diets with inclusion levels of 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days

	0%	2%	5%	10%
WG (g)	24.9±8.8b	37.1±4.1a	33.9±4.3a	37.8±6.3a
SGR (% day ⁻¹)	2.1±0.2b	2.5±2.0a	2.4±0.2a	2.7±0.1a
FI (g)	31.0±7.2b	39.8±5.7a	39.9±5.8a	41.8±7.4a
FCR	1.28±0.13b	1.08±0.13a	1.17±0.07a	1.11±0.07a

Values are expressed as means ± standard deviation. Different letters in rows represent statistical difference according to the Tukey test ($P < 0.05$). Weight gain (WG), Specific Growth Rate (SGR), Apparent Feed Intake (FI), Apparent Feed Conversion Rate (FCR).

Total alkaline protease of the gastrointestinal tract of South American catfish juveniles was higher ($P < 0.05$) in the treatment that received 5% of SPH than in the control (Table 5). Amylase levels were greater ($P < 0.05$) in the treatments with 2% and 5% of SPH than in the control treatment and the treatment with 10% of the hydrolysate.

Table 5. Specific activity of total alkaline protease and amylase in the gastrointestinal tract of South American catfish juveniles fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days

	0%	2%	5%	10%
Total alkaline protease activity*	0.26 ± 0.04 b	0.49 ± 0.07 ab	0.61 ± 0.15 a	0.37 ± 0.04 ab
Amylase activity*	0.40 ± 0.07 b	1.58 ± 0.09 a	1.43 ± 0.29 a	0.76 ± 0.18b

Values are expressed as means ± standard error of mean. Different letters in rows represent statistical difference according to the Tukey test ($P < 0.05$). *The amylase activity was expressed in $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein, 1 Unit is 1 μmol of maltose produced by unit of time and unit of incubation system ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$), and the total alkaline protease activity as the difference in the absorbance at 366 nm between sample and blank per minute, per ml, and per mg protein in the extract, specific activity.

In the microbiological analysis of the South American catfish intestines (Fig. 1), the amounts of lactic acid bacteria were greater ($P < 0.05$) in the treatment supplemented with 5% of SPH than in the other treatments. The amount of *Vibrionaceae* bacteria was smaller ($P < 0.05$) in the control treatment when compared to the other treatments. There was no difference for total heterotrophic bacteria ($P > 0.05$).

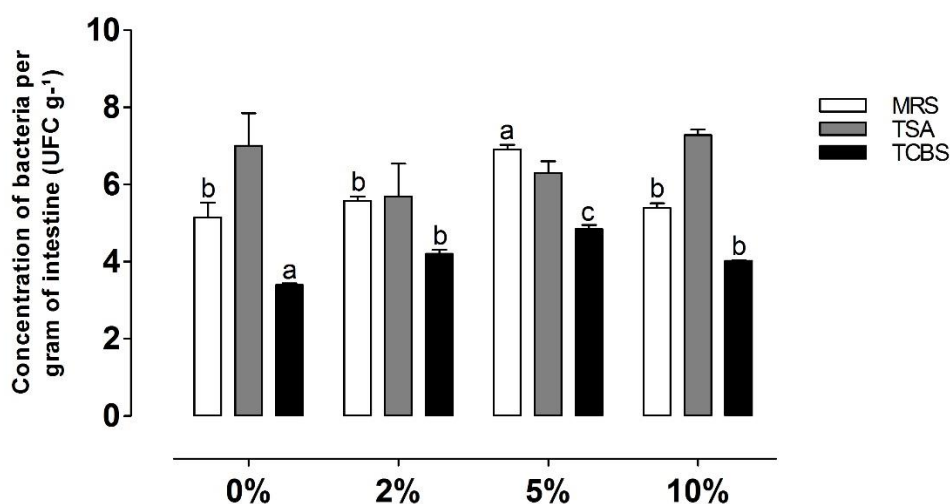


Fig. 1. Concentration of *Vibrionaceae*, total heterotrophic bacteria and total lactic microorganisms ($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ intestine) of South American catfish fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days. The intestines were incubated in TCBS for *Vibrionaceae*, in TSA for total heterotrophic bacteria and in MRS for total lactic microorganisms. Values are expressed as means ± standard error of mean. Means with different letters differed from each other according to the Tukey test ($P < 0.05$).

No alterations were shown in the histological organization of the catfish intestine when fed with the diets containing FPH (Fig. 2). No difference ($P > 0.05$) was shown between the treatments for any of the intestinal morphometry parameters (Table 6).

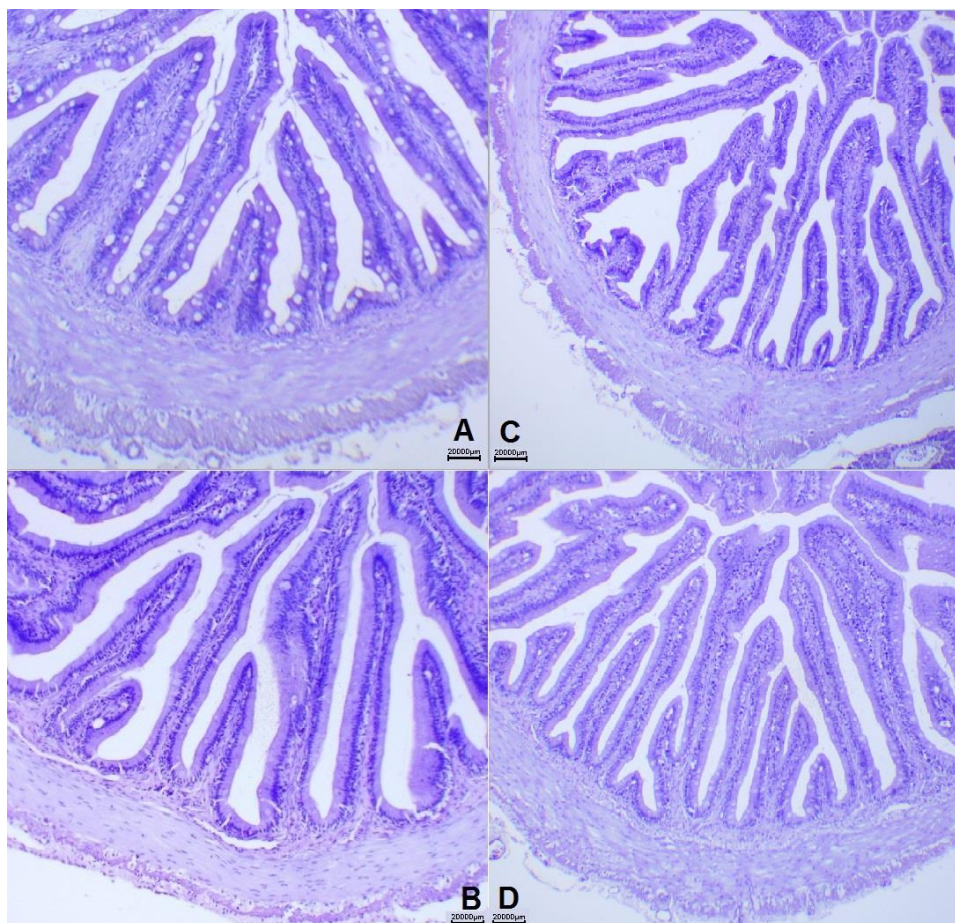


Fig. 2. Histological organization of the intestine of South American catfish juveniles fed with different diets after 56 days. A: diet without hydrolysate. B: diet supplemented with 2% of sardine protein hydrolysate (SPH). C: diet supplemented with 5% of SPH. D: diet supplemented with 10% of SPH.

Table 6 Morphometry of the gastrointestinal tract of South American catfish juveniles fed diets supplemented with 0, 2, 5 and 10% of sardine protein hydrolysate for 56 days.

	0%	2%	5%	10%
Total height (μm)	716.4 ± 74.5	758.1 ± 55.6	747.3 ± 80.3	784.1 ± 43.3
Height (μm)	591.1 ± 74.7	604.4 ± 47.1	620.5 ± 66.7	638.7 ± 31.7
Width (μm)	83.5 ± 7.7	101.9 ± 3.8	87.5 ± 5.0	101.5 ± 11.6
Thickness (μm)	38.5 ± 2.7	42.4 ± 1.9	37.4 ± 1.7	41.5 ± 3.8

Values are expressed as means $\pm$ standard error of mean. Means did not differ from each other according to the Tukey test ($P > 0.05$).

294 2.4. Discussion

295 In the present study, inclusion of SPH in South American catfish diets resulted in
 296 improved productive performance, feed consumption and feed efficiency when compared to the
 297 control treatment. The improved feed conversion can be explained by the greater bioavailability
 298 of protein in the hydrolysates due to their composition, which has greater amounts of low
 299 molecular weight peptides and free amino acids (Berge and Storebakken, 1996). The hydrolysis
 300 process has been used to enhance the chemical and functional properties of the feed without
 301 diminishing its nutritional value (Ziegler et al., 1990). Free amino acids, di- and tri-peptides are
 302 easily absorbed by enterocytes and can enter the body at higher rates than intact proteins
 303 (Ganapathy et al., 1994).

304 The inclusion of up to 10% SPH had positive effects on the fish productive performance.
 305 Previous studies found similar results for other fish species (Espe et al., 1999; Hevroy et al.,
 306 2005; Tang et al., 2008). Tang et al. (2008) found a better performance (total weight gain,
 307 relative weight gain, and specific growth rate) with the addition of 10% of pollock (*Theragra*
 308 *chalcogramma*) protein hydrolysate for large yellow croaker. On the other hand, according to
 309 Costa-Bomfim et al. (2016), the addition of 12 and 18% of shrimp protein hydrolysate to the
 310 feed of cobia juveniles resulted in lower performance when compared to the fish that received
 311 diets with inclusion levels below 6%. High quantities of low molecular weight compounds can
 312 lead to saturation of the intestine transport mechanisms (Tonheim et al., 2005). This results in
 313 an unbalanced absorption of amino acids, which in turn leads to an increase of amino acid
 314 oxidation and reduced retention of dietary protein (Aragão et al., 2004).

315 The high degree of hydrolysis of fish protein hydrolysate (FPH) favors its detection by
 316 the fish gustative system, which is sensitive to dissolved water-soluble substances and
 317 consequently increases feed consumption (Halver and Hardy, 2002; Hevroy et al., 2005; Marui
 318 and Caprio, 1992). Certain free amino acids are known for being chemo-attractants and are used
 319 for fish baits (Jones, 1989). Therefore, the increased feed consumption by the animals that
 320 received diets with SPH indicates that the hydrolysate was more attractive for the fishes when
 321 compared to the control diet (Hevroy et al., 2005; Zheng et al., 2013). Thus, the amount of SPH
 322 and the degree of hydrolysis used in this study were assumed to be adequate and with no bitter
 323 taste from the hydrolysate, which has been previously observed (Tang et al., 2008). The bitter
 324 taste is associated with the release of hydrophobic clusters found in protein molecules, which
 325 become exposed during enzymatic hydrolysis (Kristinsson, 2006).

326 The degree of hydrolysis is the parameter used to compare protein hydrolysates
 327 (Mahmoud, 1994) and can be expressed as the percentage of broken peptide bonds (Adler-

Nissen, 1986; Lahl and Braun, 1994; Mahmoud et al., 1992). The SPH exhibited a considerably high DH (47.5%), which indicates the presence of a considerable level of compounds of low molecular weight. The higher DH correlates to the higher proportion of bioactive peptides that act as growth promoters (Halver and Hardy, 2002; Marui and Caprio, 1992). The molecular weight profile of the SPH showed that 52.8% of the peptides were smaller than 10 kDa. This fraction includes the biologically active peptides that act as growth and health promoters (Aksnes et al., 2006; Bui et al., 2014; Khosravi et al., 2015; Robert et al., 2015). The growth promotion effect can explain the higher productive performance (Aksnes et al., 2006; Martínez-Alvarez et al., 2015), which was observed with the lowest concentrations of SPH as well. Most of the studies that evaluated protein hydrolysates as growth promoters suggested no association of the degree of hydrolysis and the peptide profile with the inclusion level (Bui et al., 2014; Khosravi et al., 2015; Zheng et al., 2013). Further studies about the relationship between these parameters are necessary.

Fish fed with diets containing 5% of hydrolysate showed higher activity of alkaline protease when compared to the control diet. The low molecular weight peptides may have reached the intestine faster with diets containing SPH (Ganapathy et al., 1994), with a consequent higher stimulation of alkaline protease (Lundstedt et al., 2004). In the control treatment, in which animals fed on fish meal, peptides reached the intestine slower than with the hydrolysate due to the longer time needed for the acid proteases to break the fish meal proteins. According to Lundstedt et al. (2004), this increase in enzyme secretion in the digestive tract occurs to a certain extent because excess protein in the intestines may cause an opposite effect, as observed with the 10% SPH treatment. The small number of samples ($n = 6$) may have affected this result, requiring more studies for a stronger conclusion.

Amylase activity was higher in the treatments with 2% and 5% of SPH when compared to the other treatments. However, this outcome may not be directly associated with the addition of SPH. In the diets containing the hydrolysate, the percentage of corn meal was slightly higher (up to 16%) than in the control treatment (10.5%). The amount of starch in the digestive tract may have stimulated amylase activity due to the ability of the fish to modulate the digestive and absorptive physiology according to the diet composition (Buddington et al., 1997; Corrêa et al., 2007; Lundstedt et al., 2004; Moro et al., 2010). However, as suggested with excessive protein, excessive starch in the intestines may cause an opposite effect, diminishing the amylase secretion as observed with the 10% hydrolysate treatment.

The change in the microbiota observed in the different treatments may have interfered with the amylase and protease results (Hoseinifar et al., 2017; Verschuere et al., 2000; Yanbo

and Zirong, 2006). Increased digestive enzymatic activity in fish fed with prebiotics and probiotics has been reported in several studies (Ghosh et al., 2008; Suzer et al., 2008; Wang, 2011; Wang and Xu, 2006). Kuz'mina et al. (2011) reported that proteolytic and amylolytic enzymes derived from microorganisms contribute to the fish digestion process. The production of amylase by the intestinal microbiota was detected in ayu (*Plecoglossus altivelis*), common carp (*Cyprinus carpio*), channel catfish, Japanese eel (*Anguilla japonica*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Sugita et al., 1997).

The 5% inclusion of SPH promoted the growth of *Lactobacillus* sp. when compared to the control. This result in intestinal microbiology is unprecedented in *in vivo* experiments and indicates a prebiotic effect of SPH. In addition to oligosaccharides and dietary fibers, the presence of prebiotic peptides has already been recorded (Arihara, 2006). FPH is a source of nitrogen for bacteria and may serve as a medium for microbial growth (Horn et al., 2005; Kotzamanis et al., 2007; Safari et al., 2012). An interaction between the intestinal microbiota of sea bass larvae and protein hydrolysates of marine animals (fish, mollusks or shrimp) was also observed, but the mechanism of the interaction is still unclear (Delcroix et al., 2015). Lieple et al. (2002) reported that non-glycosylated peptides derived from milk protein selectively stimulate growth of bifidobacteria. Papain-digested actomyosin hydrolysate of pork skeletal muscle was observed to enhance the growth of *Bifidobacterium* strains in culture media (Arihara et al., 2006). One of the corresponding prebiotic peptides was purified from actomyosin hydrolysate and identified as a tri-peptide (Glu-Leu-Met) (Arihara et al., 2006).

Vibrionaceae also increased with the 5% dietary inclusion of SPH when compared to the other treatments. This indicates that the hydrolysate also served as a substrate for the growth of *Vibrionaceae*, and that *Lactobacillus* sp. growth was not sufficient to impair the growth of other potentially pathogenic microorganisms. Probiotic organisms interfere in the growth of pathogens through the competitive exclusion process and the synthesis and release of bacteriocins, which are small, thermostable peptides with a restricted and broad antibacterial spectrum (Cleveland et al., 2001). Due to the increase of beneficial and pathogenic bacteria, more studies should evaluate the interaction of the hydrolysate or its purified peptides with other bacteria of functional substances, to accomplish the growth of only the beneficial bacteria while inhibiting the pathogenic ones. The results in this study may be considered as preliminary with the need of further validation with other more precise techniques, such as verifying the adhesion of *Lactobacillus* cells through electron microscopy to reveal changes in bacterial groups that explain the possible prebiotic effect.

Morphometry of the gastrointestinal tract is important for studies on fish nutrition because the intestine is the main absorption site of nutrients. In the present study, no difference was shown in the parameters assessed for intestinal morphometry. Previous studies demonstrated that sardine hydrolysate can benefit the intestinal villi (Wosniak et al., 2016) and in the present study, can promote beneficial *Lactobacillus* in the digestive tract. The intestinal morphometry was expected to be improved in the treatments with the inclusion of SPH, since it corresponds to the positive effects observed with prebiotic supplementation (Dimitroglou et al., 2010; Genc et al., 2007; Pryor et al., 2003; Yilmaz et al., 2007; Xu et al., 2009). On the other hand, prebiotics tested in various fish species showed mixed results in improving the intestinal morphometry (Buentello et al., 2010; Burr et al., 2008; Burr et al., 2010; Dimitroglou et al., 2009).

2.5. Conclusion

The SPH functioned as a growth promoter in South American catfish with inclusion levels up to 10%, with improved productive performance and nutritional efficiency. An enhanced activity of digestive enzymes and lactic acid bacteria in the intestines was observed with the addition of 5% SPH. Thus, a prebiotic effect on fish is evident and the inclusion levels may determine the effects of SPH.

2.6. Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

2.7 References

- Adler-Nissen, J., 1986. Enzyme hydrolysis of food proteins. England: Elsevier Applied Science Publishers 427 p.
- Aguila, J., Cuzon, G., Pascual, C., Domingues, D.P.M., Gaxiola, C.G., Sánchez, C.A., Maldonado, E.T., Rosas, C., 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655.
- Aguilar-Quaresma, J., Sugai, J.K., 2005. Circadian profile of feed consumption and amilase and maltase activities in the juvenile shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 141-147.

- 428 Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B.T., Albrektsen, S., 2006. Size-fractionated fish
429 hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant
430 protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture* 261, 305-317.
- 431 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of
432 Analysis, 17th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- 433 Aragão, C., Conceição, L.E.C., Fyhn, H.J., Dinis, M.T., 2004. Estimated amino acid
434 requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream
435 (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 242, 589–605.
- 436 Arihara, K., 2006. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science* 74,
437 219-229.
- 438 Arihara, K., Ishikawa, S., Itoh, M., 2006. Bifidobacterium growth promoting peptides derived
439 from meat proteins. Japan patent, submitted to government.
- 440 Bakke, S., Jordal, A.E.O., Gomez-Requeni, P., Verri, T., Kousoulaki, K., Aksnes, A.,
441 Rønnestad, I., 2010. Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial
442 expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus*
443 *morhua*). *Comp. Biochem. Phys. B Biochem. Mol. Biol.* 156, 48–55.
- 444 Bechtel, P.J., 2003. Properties of different fish processing by-products from Pollock, cod and
445 salmon. *J. Food Process. Preserv.* 27, 101-116.
- 446 Berge G.M., Storebakken T., 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon
447 (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 145, 205–212.
- 448 Bøgwald, J., Dalmo, R., Leifson, R.M., Stenbern, E., Gildberg, A., 1996. The stimulatory effect
449 of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. on Atlantic salmon,
450 *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 3-16.
- 451 Boyd, C.E., 1998. Water quality for pond aquaculture. *Ala. Agr. Exp. Sta., Auburn Univer.,*
452 *Ala.* 39 p.
- 453 Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of
454 protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- 455 Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bakkemckellep, A.M., 1997. The intestine of carnivorous
456 fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol. Scand.* 638, 67-80.
- 457 Buentello, J.A., Neill, W.H., Gatlin, D.M. III, 2010. Effects of dietary prebiotics on the growth,
458 feed efficiency and nonspecific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed
459 soybean-based diets. *Aquac. Res.* 41, 411–418.
- 460 Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., Lee, K.J., 2014. Growth performance, feed
461 utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream

- 462 (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture* 418-419,
463 11-16.
- 464 Burr, G., Hume, M., Neill, W.H., Gatlin III, D.M., 2008. Effects of prebiotics on nutrient
465 digestibility of a soybean-meal-based diet by red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus).
466 *Aquac. Res.* 39, 1680–1686.
- 467 Burr, G., Hume, M., Ricke, S., Nisbet, D., Gatlin III, D.M., 2010. In vitro and in vivo evaluation
468 of the prebiotics GroBiotic-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide
469 on the digestive microbiota and performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀
470 *Morone saxatilis*). *Microb. Ecol.* 59, 187–198.
- 471 Cleveland, J., Montville, T., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural
472 antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- 473 Corrêa, C.F., Aguiar, L.H, Lundstedt, L.M., Moraes, G., 2007. Responses of digestive enzymes
474 of tambaqui (*Colossoma macropomum*) to dietary cornstarch changes and metabolic
475 inferences. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 147, 857-862.
- 476 Costa-Bomfim, C.N., Silva, V.A., Bezerra, R. de S., Druzian, J.I., Cavalli, R.O., 2016. Growth,
477 feed efficiency and body composition of juvenile cobia (*Rachycentron canadum* Linnaeus,
478 1766) fed increasing dietary levels of shrimp protein hydrolysate. *Aquac. Res.* 1-8.
- 479 Delcroix, J., Gatesoupe, F.J., Desbruyères, E., Huelvan, C., Le Delliou, H., Le Gall, M.M.,
480 Zambonino-Infante, J.L., 2015. The effects of dietary marine protein hydrolysates on the
481 development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquac.*
482 *Nutr.* 21, 98-104.
- 483 Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J., Bradley,
484 G., 2009. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial
485 ecology and improves gut morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).
486 *J. Anim. Sci.* 87, 3226–3234.
- 487 Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010.
488 Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed
489 utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*).
490 *Aquaculture* 300, 182–188.
- 491 Espe, M., Haaland, H., Njaa, L., Raa, J., 1992. Growth of young rats on diets based on fish
492 silage with different degrees of hydrolysis. *Food Chem.* 44, 195–200.
- 493 Espe, M., Sveier, H., Høgøy, I., Lied, E., 1999. Nutrient absorption and growth of Atlantic
494 salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture* 174, 119–137.

- FAO, 2016. Fisheries and Aquaculture Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. [Internet document] URL Available at www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp (Accessed on August 20, 2016).
- Fernandez-Patron, C., Calero, M., Collazo, P.R., Garcia, J.R., Madrazo, J., Musacchio, A., Soriano, F., Estrada, R., Frank, R., Castellanos-Serra, L.R., Mendez, E., 1995. Protein reverse staining: high-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* 224, 203-211.
- Fishbase. 2017. *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) bagre da America do Sul. [<http://www.fishbase.se/summary/23351#>]. Accessed on May 16, 2017.
- Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H., 1994. Intestinal transport of amino acids and peptides. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 1773– 1794.
- García-Carreño, F.L., Navarrete Del Toro, M.A., Ezquerro, J.M., 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. Effect of protease inhibition in protein ingredients. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 36-40.
- García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N.M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., Guadiz, E.M., 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Res. Int.* 65, 469-476.
- Genc, M.A., Yilmaz, E., Genc, E., Aktas, M., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Isr. J. Aquacult.-Bamid.* 59, 10–16.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquacult. Nutr.* 14, 289–299.
- Halver, J. E., Hardy, R.W., 2002. *Fish Nutrition*. 3rd version. Elsevier Science, San Diego, USA. 2002. 839 p.
- Hevrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac. Nutr.* 11, 301–313.
- Horn, S.J., Aspmo, S.I., Eijsink, V.G.H., 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1082–1089.
- Hoseinifar, S.H., Dadar, M., Ringo, E., 2017. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: The functional feed additives scenario. *Aquac. Res.* 48, 3987-4000.

- 528 Jemil, I., Jridia, M., Nasria, R., Ktaria, N., Salem, R.B.S.B., Mehiri, M., Hajjia, M., Nasri, M.,
 529 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared
 530 from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochem.* 49, 963-972.
- 531 Jones, K.A., 1989. The palatability of amino acids and related compounds to rainbow trout,
 532 *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 34, 149-160.
- 533 Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Jeong, J.B., Lee, K.J.,
 534 2014. Effect of dietary hydrolysate supplementation on growth performance, non-specific
 535 immune response and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)
 536 challenged with *Edwardsiella tarda*. *Aquac. Nutr.* DOI: 10.1111/anu.12157
- 537 Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Kim, S.S., Jeong, J.B.,
 538 Lee, K.J., 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based
 539 diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).
 540 *Aquaculture* 435, 371-376.
- 541 Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K.D., 2009.
 542 Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow
 543 stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *J. Food Sci.* 74, C126–C133.
- 544 Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C., 2007. Effects
 545 of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut
 546 microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus*
 547 *labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 147, 205–214.
- 548 Kristinsson, H.G., 2006. The production, properties, and utilization of fish protein hydrolysates.
 549 In: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. *Food Biotechnol.* New York: Taylor
 550 & Francis Group. pp. 1111-1133.
- 551 Kuz'mina, V.V., 2011. Influence of pH upon the activity of glycosidases and proteinases of
 552 intestinal mucosa, chyme and microbiota in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 345–353.
- 553 Lahl, W.J., Braun, S.D., 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food*
 554 *Technol.* 48, 68-71.
- 555 Liaset, B., Lied, E., Espe, M., 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting
 556 industry: Chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.* 80, 581–
 557 589.
- 558 Lieple, C., Adermann, K., Raida, M., Magert, H.J., Forssman, W.G., Zucht, H.D., 2002. Human
 559 milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.*
 560 269, 712–718.

- 561 Lundstedt, L.M., Melo, J.F.B., Moraes, G., 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of
562 *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition.
563 Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 137, 331–339.
- 564 Mahmoud, M.I., Malone, W.T., Cordle, C.T., 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of
565 degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. J. Food Sci. 57, 1223-1229.
- 566 Mahmoud, M.I., 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in
567 nutritional products. Food Technol. 48, 89-95.
- 568 Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., Brenes, A., 2015. Protein hydrolysates from animal
569 processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding:
570 A review. Food Res. Int. 73, 204-212.
- 571 Marui, T., Caprio, J., 1992. Teleost gustation. Fish chemoreception. Ed.T.J Hara, London, pp.
572 171-198.
- 573 Mello, H., Moraes, J.R.E., Niza, I.G., Moraes, F.R., Ozório, R.O.A., Shimada, M.T., Engracia-
574 Filho, J.R., Claudiano, G.S., 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis
575 de Tilápia-do-Nilo. Pesq. Vet. Bras. 33, 724-730.
- 576 Meyer, G., Fracalossi, D.M., 2004. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*,
577 at two dietary energy concentrations. Aquaculture 240, 331-343.
- 578 Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.
579 Analytical Chemistry 31,426-428.
- 580 Moro, G.V., Camilo, R.Y., Moraes, G., Fracalossi, D.M., 2010. Dietary non-protein energy
581 sources: growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá,
582 *Rhamdia quelen*. Aquac. Res. 41, 394-400.
- 583 Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food
584 protein degree of hydrolysis. Food Chem. Toxicol. 66, 642-646.
- 585 Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L., Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high
586 levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles.
587 Aquaculture 179, 195-201.
- 588 Pryor, G.S., Royes, J.B., Chapman, F.A., Miles, R.D., 2003. Mannan oligosaccharides in fish
589 nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure
590 in Gulf of Mexico sturgeon. N. Am. J. Aquacult. 65, 106–111.
- 591 Rick, W., Stegbauer, H.P., 1974. Alpha-Amylase: Measurement of reducing groups. In:
592 Bergermeyer, H.U. (ed.) Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed., Weinheim: Verlag
593 Chemie, p. 885-915.

- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Henry, J., 2015. Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochem.* 50, 487-492.
- Sabeena-Farvin, K.H., Andersen, L.L., Nielsen, H.H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., Jessen, F., 2014. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem.* 149, 326-334.
- Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A., Rasco, B., 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food Bioprocess. Technol.* 5, 73-79.
- Salhi, M., Bessonarta, M., Chediakb, G., Bellagambab, M., Carnevia, D., 2004. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture* 231, 435-444.
- Schagger, H., 2006. Tricine-sds-page. *Nature protocols* 1, 16. DOI: 10.1038/nprot.2006.4.
- Srichanun, M, Tantikitti, C, Kortner, T.M., Krogdahl, A., Chotikachinda, R., 2014. Effects of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. *Aquaculture* 428-429, 195-202.
- Sugita, H., Kawasaki, J., Deguchi, Y., 1997. Production of amylase by intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 105–108.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., Küçüksari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140–145.
- Tacon, A.G.J., 1990. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – A training manual. The essential nutrients. Brasília: FAO 117 p.
- Tang, H., Wu, T., Zhao, Z., Pan, X., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 684–690.
- Tonheim, S.K., Espe, M., Hamre, K., Ronnestad, I., 2005. Pre-hydrolysis improves utilisation of dietary protein in the larval teleost Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 321, 19–34.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotics bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rew.* 64, 655–671.

- 626 Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bubmann, B., Beermann, C., 2016. Detection of
627 antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout
628 by-products with trout pepsin. Food Chem. 205, 221–228.
- 629 Wang, Y.B., Xu, Z.R., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on
630 growth performance and digestive enzyme activities. Anim. Feed Sci. Technol., 127, 283–
631 292.
- 632 Wang, Y., 2011. Use of probiotics *Bacillus coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris* and
633 *Lactobacillus acidophilus* as growth promoters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)
634 fingerlings. Aquacult. Nutr. 17, 372–378.
- 635 Wosniak, B., Melim, E.W.H., Ha, N., Uczay, J., Pilatti, C., Pessatti, M.L., Fabregat, T.E.H.P.,
636 2016. Effect of diets containing different types of sardine waste (*Sardinella* sp.) protein
637 hydrolysate on the performance and intestinal morphometry of silver catfish juveniles
638 (*Rhamdia quelen*). Lat. Am. J. Aquat. Res. 44, 957–966.
- 639 Yanbo, W., Zirong, X., 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on
640 growth performance and digestive enzyme activities. Anim. Feed Sci. Technol. 127, 283–
641 292.
- 642 Yilmaz, E., Genc, M.A., Genc, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth,
643 body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus*
644 *mykiss*. Isr. Aquacult-Bamid 59, 182–188.
- 645 Xu, B., Wang, Y., Li, J., Li, Q., 2009. Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth
646 performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (*Carassius*
647 *auratus gibelio*). Fish Physiol. Biochem. 35, 351–357.
- 648 Zheng, K., Xu, T., Qian, C., Liang, M., Wang, X., 2013. Effect of low molecular weight fish
649 protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder
650 (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. Aquac. Nutr. 20, 372–380.
- 651 Ziegler, F., Ollivier, J.M., Cynober, L., Masini, J.P., Couldray-Lucas, C., Levy, E., Gibondeau,
652 J., 1990. Efficacy of enteral nitrogen support in surgical patients: small peptides vs. non-
653 degraded proteins. Gut 31, 1277–1283.

3 CAPÍTULO 3 – O perfil de peptídeos do hidrolisado proteico de sardinha afeta a utilização do alimento e a microbiota intestinal da tilápias-do-Nilo

Natalia Ha^a, Luiz Augusto Cipriani^a; Nandara Soares de Oliveira^a; Juliano Uczay^a; Marcos Luiz Pessatti^b; Thiago El Hadi Perez Fabregat^{a,*}

^a Universidade do Estado de Santa Catarina. UDESC – Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, 88520-000 - ha.natalia@yahoo.com.br; cipriani_luiz@hotmail.com; nandara.soares@hotmail.com; uczay@ufsm.br; thiagofabregat@hotmail.com*

^b Universidade do Vale do Itajaí. UNIVALI - R. Uruguai, 458 - Centro, Itajaí, SC, 88302-202 - pessatti@univali.br

*Corresponding authors at: UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, Avenida Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, Brazil. Zip code 88520-000. thiagofabregat@hotmail.com

Resumo

Este estudo avaliou o perfil de peptídeos dos hidrolisados proteicos de musculatura de sardinha (*Sardinella* spp.) residual (SPH) sobre as respostas de desempenho zootécnico, composição corporal, reservas energéticas teciduais, parâmetros hematológicos e bioquímicos, metabolismo proteico, antioxidantes nos tecidos e microbiologia intestinal de juvenis de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os SPH foram produzidos com carcaças de sardinhas utilizando complexo de protease bacteriana e foram caracterizados quanto ao grau de hidrólise (GH) e perfil de peptídeos de acordo com o peso molecular. Os tratamentos foram: controle (sem SPH); SPH com GH baixo (5,5%); SPH com GH intermediário (27,9%) e SPH com GH alto (62,5%). O SPH substituiu 5% da proteína total das dietas. Durante 56 dias, 180 tilápias ($6,16 \pm 2,0$ g) foram alimentadas até a saciedade aparente. Os SPH apresentaram predominância de peptídeos de alto peso molecular, mas com a distribuição dos peptídeos de pesos moleculares diferentes. Os resultados deste estudo mostraram que os hidrolisados foram pouco palatáveis, pois afetaram negativamente o crescimento e as reservas metabólicas dos animais. As análises hematológicas e bioquímicas do sangue não foram afetadas. As dietas com inclusão de hidrolisado afetaram a população microbiana, o que indica a possibilidade de usar este ingrediente para modular as populações intestinais.

Palavras-chave: Grau de hidrólise; Hidrólise enzimática; Peptídeos bioativos; *Oreochromis niloticus*; Subprodutos de pescado; *Sardinella* spp.

Peptides profile of the sardine protein hydrolysate affects the food utilization and the intestinal microbiota of Nile tilapia

Abstract

This study evaluated the peptides profile of the protein hydrolysates of sardine muscle residue (SPH) over the answers of growth performance, corporal composition, tissue energetic reserves, hematological and biochemical parameters, parameters of protein metabolism, antioxidants on tissues and intestinal microbiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles. The SPH were produced with sardine carcasses by utilizing complex of bacterial protease and were characterized regarding the degree of hydrolysis (DH) and the peptide profile according to the molecular weight. The treatments were: control (without SPH); SPH with low DH (5.5%); SPH with intermediary DH (27.9%) and SPH with high DH (62.5%). The SPH substituted 5% of total dietary protein. For 56 days, 180 tilapias (6.16 ± 2.0 g) were fed until apparent satiety. The SPH showed predominance of high molecular weight peptides, although with the distribution of the peptides with different molecular weights. The results of this study showed that the hydrolysates were little palatable, because they negatively affected the growth and the metabolic reserves of the animals. The hematological and biochemical analysis of the blood were not affected. The diets with inclusion of hydrolysate affected the microbial population, which indicates the possibility to use this ingredient to module the intestinal populations.

Keywords: Degree of hydrolysis. Enzymatic hydrolysis. Bioactive peptides. *Oreochromis niloticus*. Fish by-products. *Sardinella* spp.

3.1 Introdução

O hidrolisado proteico de pescado (FPH) é proveniente da hidrólise enzimática de subprodutos derivados de subprodutos de pescado (Chalamaiah et al., 2012). Além de agregar valor a esses subprodutos, a hidrólise enzimática recupera proteínas de alto valor, melhora sua disponibilidade e digestibilidade e produz um produto com boas propriedades funcionais (Shahidi et al., 2001). O FPH tem sido utilizado como substituto à farinha de pescado, um recurso oneroso e cada vez mais escasso (Robert et al., 2015; Siddik et al., 2018; Swanepoel; Goosen, 2018). Entretanto, devido a sua atividade biológica também pode ser considerado um promotor de crescimento (Berge; Storebakken, 1996; Bui et al., 2014; Srichanun et al., 2014; Xu et al., 2016).

As propriedades funcionais dos FPH são derivadas da presença de peptídeos biologicamente ativos, resultantes do processo de hidrólise (Chalamaiah et al., 2012; Robert et al., 2015). A composição de aminoácidos e o perfil de peptídeos bioativos dos FPH dependem de fatores como: tipo de enzima, substrato, condições de hidrólise, como a concentração de enzima, a temperatura, o pH e o tempo (Klompong et al., 2009). Esses peptídeos são formados por aminoácidos livres e di e tri-peptídeos (0-500 Da) (Aksnes et al., 2006; Robert et al., 2015). Os peptídeos com massa molecular mais elevado (>500 Da) também podem proporcionar boa atividade biológica (Robert et al., 2015), normalmente associada a 3-20 aminoácidos (Kim et al., 2010). Podem apresentar propriedades como: antimicrobiana (Robert et al., 2015; Wald et al., 2016), antioxidante (García-Moreno et al., 2014; Zamora-Sillero et al., 2018), imunoestimulante (Bøgwald et al., 1996; Gildberg et al., 1996; Liang et al., 2006; Swanepoel; Goosen, 2018), prebiótica (Ha et al., 2018), entre outras (Adler-Nissen, 1986; Aksnes et al., 2006; Kristinsson; Rasco, 2000).

Estudos anteriores demonstraram efeitos positivos com a inclusão de hidrolisados proteicos de sardinha (*Sardinella* spp.) em dietas para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) melhorando a morfometria intestinal (Wosniak et al., 2016), desempenho zootécnico e a microbiologia intestinal (Ha et al., 2018). Mas há ainda a necessidade de se estudar os efeitos da suplementação com FPH com diferentes perfis de peptídeos em dietas para outras espécies de peixes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de peptídeos dos hidrolisados proteicos de sardinha (SPH) sobre as respostas de desempenho zootécnico, composição corporal, reservas energéticas teciduais, parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos, de metabolismo proteico e antioxidantes nos tecidos e microbiologia intestinal de juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Produção e caracterização do hidrolisado de resíduo de sardinha

Os hidrolisados proteicos de resíduos do músculo de sardinha (SPH) foram produzidos com carcaças limpas (desprovidas de cabeça e vísceras) de sardinhas (*Sardinella* spp.) provenientes de uma indústria de processamento de pescado, da cidade de Itajaí/SC. As amostras foram homogeneizadas com água na proporção de 1:1 (volume:volume) em liquidificador e incubadas com a enzima Protamex® Novozymes A/S nas quantidades de 1:2000 enzima:peixe por 20 minutos (GH baixo - 5,5%); 1:750 enzima:peixe por 30 minutos (GH intermediário - 27,9%) e 1:200 enzima:peixe por 150 minutos (GH alto - 62,5%) a 50°C.

102 Em seguida, foi realizada a inativação da enzima a 80°C durante 15 minutos. O material
103 resultante foi concentrado em estufa a 55-60°C e foi congelado a -20°C até o momento do uso.

104 As análises da composição química foram realizadas de acordo com os métodos
105 recomendados pela AOAC (2000). O teor de umidade foi determinado em balança por radiação
106 infravermelha e o teor de lipídeos pelo método de Soxhlet. O teor de proteínas foi determinado
107 pelo método de Kjeldahl e o de matéria mineral por incineração em mufla a 550-600°C. O grau
108 de hidrólise (GH%) foi determinado por metodologia modificada a partir de Nielsen et al.
109 (2001) (Tabela 1). Esta análise consiste na quantificação da proporção de grupamentos amino-
110 livres na fração solúvel do hidrolisado de proteína, pela reação destes grupamentos com o “o-
111 phthaldialdehyde” (OPA), em relação à proteína total da matéria-prima. Os ensaios foram
112 realizados em microplacas com fundo transparente por adição de 40 µl de amostra e 260 µl do
113 reagente OPA. As leituras de absorbância foram feitas a 340 nm no leitor de microplacas
114 modelo Genius (Tecan®) e o resultado expresso como GH (%) pela equação 1:

115 Equação 1: $GH (\%) = [(Serina-NH_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv/g de proteína}] / h_{tot} * 100$

116 Os valores de α , β e h_{tot} foram previamente determinadas por Adler-Nissen (1986), para
117 peixes: 1,00; 0,40 e 8,6, respectivamente.

118 Para a determinação e distribuição de massa molecular dos peptídeos presentes nos
119 hidrolisados foram realizadas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições
120 desnaturantes (Tricina-SDS-PAGE 16% resolving gel, spacer gel 10%, stacking gel 4%),
121 conforme Schagger (2006) (Tabela 2). As proteínas foram colocadas em corrida eletroforética
122 de aproximadamente 40 minutos em mini-géis, visando o estabelecimento das condições ideais
123 de corrida. Foram realizadas corridas em géis de 16 cm, de cerca de 6 horas a 90V (voltagem
124 constante) e cerca de 80 mA inicial (por gel) à temperatura ambiente, utilizando como tampão
125 de corrida tris-tricina (100 mmol/l de Tris e 100 mmol/l de tricina), pH 8,25, em SDS 0,1%. O
126 DTT foi incluído apenas no momento do uso. Foi utilizado como padrão uma mistura de
127 proteínas de baixo massa molecular (Biorad). As proteínas foram fixadas no gel e reveladas
128 com azul de Coomassie.

129

130

131

132

Tabela 1. Composição do hidrolisado proteico de sardinha (*Sardinella* spp.).

	Grau de Hidrólise (%)		
	5,5	27,9	62,5
Proteína Bruta (%)	72,64	79,38	76,52
Energia Bruta (kcal.kg ⁻¹)	5068,44	5564,28	5347,88
Extrato Etéreo (%)	2,30	11,32	8,66
Matéria Mineral (%)	4,79	5,75	6,87

Valores baseados na matéria seca.

Tabela 2. Distribuição de peptídeos dos hidrolisados proteicos de sardinha (*Sardinella* spp.).

Massa molecular aparente Perfil de peptídeos dos SPH	Quantidade (%)		
	GH (%)		
	5,5	27,9	62,5
> 100.000 Da	13,66	3,62	12,18
50.100-100.000 Da	24,88	5,39	19,25
30.100-50.000 Da	18,76	2,51	3,67
20.100-30.000 Da	4,44	2,95	7,07
10.100-20.000 Da	20,28	5,83	25,10
5.100-10.000 Da	17,02	75,78	11,90
2.100-5.000 Da	0,81	1,48	15,85
1.100-2.000 Da	0,16	0,89	3,81
< 1.000 Da	0,00	1,55	1,16

3.2.2 Dietas experimentais

As dietas avaliadas foram: um controle (sem inclusão do SPH) e três dietas com a suplementação com o SPH com diferentes graus de hidrólise (GH baixo-5,5%; GH intermediário-27,9% e GH alto-62,5%). O SPH substituiu 5% da proteína da dieta. A proporção de proteína animal foi mantida entre os tratamentos. As dietas foram isoproteicas (30,5% de proteína bruta) e isoenergéticas (cerca de 4080 kcal de energia bruta kg⁻¹), formuladas de acordo com as exigências da tilápia-do-Nilo (Furuya, 2010) (Tabela 3). Os ingredientes foram triturados em moinho de faca com peneira de 2 mm de diâmetro de malha, misturados, peletizados com adição de água (30%) e levados à estufa a 45°C por 48 horas. As dietas foram conservadas sob refrigeração (4°C) até o momento da utilização. Todas as dietas prontas foram analisadas de acordo com metodologia recomendada pela AOAC (2000).

150 **Tabela 3.** Composição das dietas experimentais.

(%)	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
Farelo de Soja	38,0	38,0	38,0	38,0
Farinha de Milho	31,0	34,11	34,7	34,46
Farelo de Trigo	13,0	13,0	13,0	13,0
Farinha de Pescado	16,0	6,0	6,0	6,0
Hidrolisado Proteico de Sardinha	-	6,89	6,3	6,54
Óleo de Soja	1,0	1,0	1,0	1,0
Premix ¹	1,0	1,0	1,0	1,0
Composição calculada				
Matéria Seca (%)	89,10	84,67	92,54	85,77
Proteína Bruta (%)	30,31	30,54	30,59	30,57
Energia Bruta (kcal.kg ⁻¹)	4008,34	4093,25	4117,15	4107,17
Extrato Etéreo (%)	4,38	4,09	5,07	4,51
Fibra Bruta (%)	4,79	4,80	4,85	4,81
Matéria Mineral (%)	7,63	5,32	7,24	5,45

151 ¹ Ácido fólico – 2.400 mg, ácido nicotínico – 48 g, ácido pantotênico – 24 g, biotina – 96 mg, vitamina A –
 152 2.400.000 UI, vitamina D3 – 400.000 UI, vitamina E – 24.000 UI, vitamina B1 – 9.600 mg, vitamina B2 – 9.600
 153 mg, vitamina B6 – 9.600 mg, vitamina B12 – 9.600 mg, vitamina K3 – 4.800 mg, vitamina C – 96 g, ferro – 100
 154 g, manganês – 40 g, zinco – 6.000 mg, cobalto – 20 mg, iodo – 200 mg, selênio – 200 mg, antioxidante – 19,6 g.

155

156

3.2.3 Animais e instalações

157 Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado de Santa
 158 Catarina (número de protocolo CEUA: 5575310518). Foram utilizados 180 juvenis de tilápia-
 159 do-Nilo (peso médio de $6,16 \pm 2,0$ g), adquiridos de piscicultura comercial e previamente
 160 aclimatados nas condições experimentais por 30 dias. No final do período de aclimação, os
 161 peixes foram distribuídos em 20 caixas de polietileno com volume útil de 70 litros ligadas em
 162 sistema de recirculação de água equipado com filtro mecânico e biológico. O fotoperíodo foi
 163 de 12 horas de luz. A temperatura foi mantida constante por aquecimento com aquecedor com
 164 termostatos e a oxigenação foi realizada com o auxílio de um compressor de ar acoplado a
 165 mangueiras de silicone e pedras porosas. Os parâmetros de qualidade da água nos aquários
 166 foram monitorados diariamente utilizando medidores portáteis e kits comerciais: oxigênio
 167 dissolvido ($6,72 \pm 0,54$ mg.dl⁻¹), temperatura ($27,8 \pm 0,91^{\circ}\text{C}$), pH ($8,23 \pm 0,16$) amônia total
 168 (LabconTest, Alcon Pet, Brasil) ($0,2 \pm 0,1$ mg.NH₃ l⁻¹) e estiveram dentro dos limites
 169 considerados adequados para a piscicultura (Boyd, 1998).

Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais até a saciedade aparente, em três refeições diárias (09h00m; 13h00m e 17h00m) durante 56 dias. Diariamente foi realizada a limpeza dos aquários para retirada de matéria orgânica.

3.2.4 Desempenho zootécnico

Todos os peixes foram mantidos em jejum por 24h e anestesiados em solução de eugenol ($1 \text{ g} \cdot 10 \text{ l}^{-1}$ de água) para pesagem e medição individual, no início e no final do experimento. Os parâmetros de desempenho zootécnico avaliados foram: ganho de peso (ganho de peso, $\text{g} = \text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}$), consumo alimentar aparente (g); conversão alimentar aparente ($\text{consumo alimentar aparente} = \text{consumo de ração} / \text{ganho de peso total}$) e taxa de crescimento específico (taxa de crescimento específico, $\% \cdot \text{dia}^{-1} = [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{período experimental}] \cdot 100$) (Tacon, 1990).

Aos 56 dias, depois de anestesiados, os animais foram eutanasiados por secção medular para coleta dos materiais biológicos para realização das análises descritas a seguir.

3.2.5 Composição corporal

Os peixes inteiros foram congelados em freezer a -10°C . As amostras congeladas foram moídas e secas em estufa com circulação de ar forçado, à 60°C , até peso constante. Posteriormente, foram realizadas as análises de proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral (AOAC, 2000).

3.2.6 Reservas energéticas teciduais

Os peixes foram laparotomizados para retirada das amostras de fígado que foram congeladas em freezer a -10°C . Foram retirados também fragmentos de músculo do dorso do animal de, aproximadamente, 3 cm. Nas amostras de fígado e músculo foram realizadas as análises para determinação do glicogênio (Dubois et al., 1956).

3.2.7 Parâmetros hematológicos

Aos 56 dias de experimento, os peixes foram submetidos à colheita de sangue por meio de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis. Microtubos com anticoagulante (heparina) foram utilizados para armazenamento do sangue destinado ao hemograma completo. A determinação do hematócrito foi realizada pela técnica do microhematócrito (Goldenfarb et al., 1971), dosagem da taxa de hemoglobina pelo método da cianometa-hemoglobina (Blaxhall; Daisley, 1973) e contagem total de eritrócitos pelo método de Natt; Herrick (1952). O cálculo do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina

corpuscular média (HCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram realizados segundo Wintrobe (1934):

$$\text{VCM } (\mu^3) = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{n^{\circ}\text{total de eritrócitos}}$$

$$\text{HCM } (\text{pg cel}^{-1}) = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{n^{\circ}\text{total de eritrócitos}}$$

$$\text{CHCM } (\text{g dL}^{-1}) = \frac{\text{Concentração de Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

3.2.8 Bioquímica e metabolismo proteico nos tecidos

Nas brânquias, no fígado e no músculo foram determinadas as quantidades de aminoácidos (Aa) livres e amônia. Para a quantificação dos Aa livres foi utilizada a metodologia de Spies (1957). A glicose, o colesterol e os triglicerídeos foram quantificados em amostras de fígado a partir de kit comercial. A amônia total foi determinada pela técnica do salicilato (Verdouw et al., 1978).

3.2.9 Parâmetros antioxidantes nos tecidos

Os tecidos foram homogeneizados conforme descrito por Azambuja et al. (2011). A peroxidação lipídica foi estimada usando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege; Aust, 1978). Os resultados são apresentados em nmol de malondialdeído (MDA) por grama de tecido. O teor de tióis (-SH) proteicos e não proteicos (NPSH) foram mensurados após reação com o ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (Ellman, 1959). O conteúdo de tióis proteicos e NPSH está apresentado em $\mu\text{mol SH.g}^{-1}$ de tecido.

3.2.10 Avaliação microbiológica

Para a avaliação da microbiota intestinal, os intestinos dos peixes foram retirados, homogeneizados com solução salina estéril (SSE) a 0,65% e macerados. Em seguida, foi realizada a diluição seriada (1:10) em tubos de ensaio com SSE e as amostras foram semeadas em placas de Petri com os meios de cultura ágar TCBS (tiosulfato citrato bile sacarose), ágar MRS (Man Rogosa Sharpe) e ágar TSA (triptona de soja), para a contagem de bactérias vibriônicas, ácido-láticas e heterotróficas totais, respectivamente. As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa a 35°C. As contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas após 24-48 horas de incubação.

3.2.11 Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições. Os dados foram submetidos ao Teste de Cramer-von Mises para verificar a normalidade e ao Teste de Levene para verificar a homocedasticidade das variâncias. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Dunnett (5%).

3.3 Resultados

3.3.1 Desempenho Zootécnico

Aos 56 dias de experimento, o peso final, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico e o consumo foram maiores ($P < 0,05$) para o tratamento controle em relação aos tratamentos com hidrolisados, independente do GH. A conversão alimentar foi maior ($P < 0,05$) para o tratamento GH27,9 em relação aos demais tratamentos. Não houve diferença ($P > 0,05$) na sobrevivência (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de desempenho zootécnico de juvenis de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise.

	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
Peso Inicial (g)	6,11±0,06	6,20±0,06	6,21±0,09	6,14±0,08
Peso Final (g)	60,34±6,55	45,07±4,85*	41,14±4,56*	43,24±3,48*
Ganho de Peso (g)	54,22±6,56	38,87±4,88*	34,92±4,51*	37,1±3,44*
Taxa de Crescimento Específico (%.dia⁻¹)	4,08±0,19	3,53±0,21*	3,37±0,19*	3,48±0,13*
Consumo (g.cx⁻¹)	65,91±6,22	53,04±4,35*	53,91±3,57*	52,14±4,28*
Conversão Alimentar Aparente	1,22±0,06	1,38±0,16	1,56±0,15*	1,41±0,05
Sobrevivência (%)	97,8±4,97	88,9±19,25	93,3±9,94	95,6±6,09

Valores são médias ± DP. Médias seguidas por * na coluna diferem pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

3.3.2 Composição corporal

A matéria seca, a proteína bruta e o extrato etéreo não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Composição corporal de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise.

	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
Matéria Seca (%)	23,91±0,49	23,84±0,9	25,06±1,33	26,04±2,68
Proteína Bruta (%)	16,77±1,15	18,94±0,33	18,15±1,86	16,93±1,29
Extrato Etéreo (%)	4,79±0,45	3,83±0,91	6,15±1,11	7,07±1,92

*Valores baseados na matéria seca.

3.3.3 Aspectos sanguíneos

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para as respostas hematológicas e bioquímica do sangue após 56 dias de experimento (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise.

	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
Glicose (mg.dl⁻¹)	24,8±7,23	31,94±28,57	32,8±13,34	23,6±18,1
PPT (g.dl⁻¹)	4,49±0,45	4,28±0,44	4,53±0,12	4,22±0,72
HTC (%)	33,67±3,16	33,67±3,15	35,48±2,20	31,95±2,61
HGB (g.dl⁻¹)	9,54±0,60	9,34±1,05	9,39±1,58	8,50±0,89
RBC (x10⁶ mm⁻³)	1,49±0,20	1,50±0,19	1,64±0,20	1,47±0,13
VCM (μ3)	227,39±22,7	218,98±34,82	211,86±37,23	220,05±25,96
HCM (pg.cel⁻¹)	61,72±2,34	62,8±9,14	62,28±7,67	57,98±5,1
CHCM (g.dl⁻¹)	29,5±4,23	28,9±3,74	27,78±5,71	26,81±3,96

Valores são médias ± DP. HTC – Hematócrito; PPT – Proteína Plasmática Total; HGB – Hemoglobina; RBC – Número de Eritrócitos; VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Concentração de Hemoglobina Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Médias não diferem pelo teste de ANOVA ($P<0,05$).

3.3.4 Aspectos bioquímicos e metabolismo proteico dos tecidos

Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para a glicose, o colesterol e os triglicerídeos no fígado e para as concentrações de amônia e de aminoácidos no fígado e músculo (Tabela 7). A concentração de proteína diferiu apenas no músculo, sendo maior no controle em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$) (Tabela 7). O glicogênio no fígado foi maior ($P>0,05$) nos peixes do tratamento controle em relação aos tratamentos com a inclusão de hidrolisado, mas não apresentou diferença ($P>0,05$) no músculo (Tabela 7).

Tabela 7. Glicose, colesterol e triglicerídeos e glicogênio no fígado e concentração de amônia, aminoácidos e proteína no fígado e músculo de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de hidrólise.

	Grau de Hidrólise (%)			
	Controle	5,5	27,9	62,5
<u>Fígado</u>				
Colesterol (mg.dl⁻¹)	2,14±0,64	3,25±0,36	2,65±1,15	2,88±0,82
Glicose (mg.dl⁻¹)	64,20±6,21	86,55±25,9	65,63±14,3	73,93±21,3
Triglicerídeos (mg.dl⁻¹)	142,81±31,1	159,55±51,0	172,93±73,3	210,74±85,5
Amônia (mg.l⁻¹)	0,91±0,39	1,06±0,51	1,05±0,56	0,63±0,22
Aminoácidos (µg Aa.g tecido⁻¹)	20,18±6,31	25,15±10,3	16,68±4,99	22,67±11,4
Proteína (mg.ml⁻¹)	21,24±4,22	22,30±2,68	23,11±2,65	22,75±3,45
Glicogênio (µmol.g⁻¹)	13,43±1,16	8,84±2,39*	7,93±3,94*	8,05±2,14*
<u>Músculo</u>				
Amônia (mg.l⁻¹)	2,29±0,42	1,98±0,45	2,05±0,32	2,08±0,36
Aminoácidos (µg Aa.g tecido⁻¹)	9,96±5,36	8,28±4,96	10,40±5,05	10,39±3,73
Proteína (mg.ml⁻¹)	18,67±1,59	11,71±2,01*	14,06±2,49*	16,0±1,29*
Glicogênio (µmol.g⁻¹)	1,27±0,21	0,98±0,10	1,35±0,27	1,12±0,21

Valores são médias ± DP. Médias seguidas por * na coluna diferem pelo teste de Dunnett (P<0,05).

3.3.5 Respostas antioxidantes

O TBARS no fígado foi maior (P<0,05) no controle em relação aos tratamentos GH27,9 e GH62,5 (Tabela 8) e não diferiu (P>0,05) do tratamento GH5,5. A concentração de NPSH no fígado foi maior (P<0,05) no controle em relação aos demais tratamentos (Tabela 8). No músculo e nas brânquias, não houve diferença (P>0,05) para o TBARS e o NPSH (Tabelas 8).

292 **Tabela 8.** TBARS e NPSH no fígado e músculo de tilápias-do-Nilo alimentadas durante 56
 293 dias com dietas contendo hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus de
 294 hidrólise.

	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
<u>Fígado</u>				
TBARS (nmol.MDA.g⁻¹)	3,38±1,12	3,53±1,03	1,99±0,43*	1,52±0,49*
NPSH (µm SH.g tecido⁻¹)	0,09±0,02	0,04±0,02*	0,06±0,02*	0,06±0,02*
<u>Músculo</u>				
TBARS (nmol MDA.g⁻¹)	1,92±0,49	1,85±0,40	1,68±0,39	1,63±0,48
NPSH (µm SH.g tecido⁻¹)	0,04±0,02	0,04±0,04	0,03±0,01	0,03±0,03

295 Valores são médias ± DP. Médias seguidas por * na coluna diferem pelo teste de Dunnett (P<0,05).

296

297 3.3.6 Avaliações microbiológicas

298 As concentrações de bactérias heterotróficas totais foram maiores (P<0,05) para o
 299 tratamento controle em relação aos demais tratamentos. Para a concentração de bactérias ácido
 300 lácticas não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos testados. As concentrações de
 301 vibrionáceas foram menores para os tratamentos GH5,5 e GH27,9 em relação ao controle
 302 (Tabela 9).

303

304 **Tabela 9.** Concentração de bactérias por grama de intestino (UFC g⁻¹) de tilápias alimentadas
 305 com dietas suplementadas com hidrolisado proteico de resíduo de sardinha com diferentes graus
 306 de hidrólise por 84 dias. Onde os intestinos foram cultivados em TCBS para vibrionáceas, TSA
 307 para bactérias heterotróficas totais e MRS para bactérias ácido-láticas totais.

	Controle	Grau de Hidrólise (%)		
		5,5	27,9	62,5
TSA	5,68±0,31	5,04±0,26*	4,90±0,24*	5,10±0,37*
MRS	2,70±0,70	3,11±0,41	3,04±0,24	2,79±0,32
TCBS	3,93±0,58	2,96±0,46*	2,97±0,33*	3,37±0,67

308 Valores são médias ± DP. Médias seguidas por * na coluna diferem pelo teste de Dunnett (P<0,05). Onde os
 309 intestinos foram cultivados em TCBS para vibrionáceas, TSA para bactérias heterotróficas totais e MRS para
 310 bactérias ácido-láticas totais.

311

312 3.4 Discussão

313 A inclusão dos SPH em dietas de tilápias-do-Nilo interferiu negativamente no
 314 desempenho zootécnico e eficiência alimentar. O hidrolisado proteico de sardinha atuou como
 315 um promotor de crescimento para o jundiá (Ha et al., 2018) e era esperado que este resultado
 316 se repetisse para a tilápia. As dietas contendo SPH foram menos ingeridas e isso pode explicar

a falta de resultados positivos. Wosniak et al. (2016) demonstraram que a matéria prima e o tipo de hidrolisado de sardinha interferem na palatabilidade. Em geral, os outros autores observaram melhora no consumo dos peixes que ingeriram dietas contendo hidrolisado de pollock (*Theragra chalcogramma*) (Refstie et al., 2004; Zheng et al., 2013) e hidrolisado de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*) (Leduc et al., 2018). Porém, em alguns trabalhos o consumo das dietas contendo hidrolisado de monkfish (*Lophius vomerinus*) foi menor para bagre Africano (*Clarias gariepinus*) (Swanepoel; Goosen, 2018).

O GH dos hidrolisados não afetou o consumo das dietas pelos juvenis de tilápia. Hidrolisados de sardinha com GH mais alto normalmente tem maior atratividade (Broggi et al., 2017) e resultam em maior consumo (Wosniak et al., 2016). A hidrólise resulta em peptídeos de baixo peso molecular associados à melhora na palatabilidade e atratividade da dieta (Aksnes et al., 2006). O processo também pode resultar um sabor amargo no hidrolisado devido à liberação de peptídeos que contém aminoácidos hidrofóbicos. No presente estudo os SPH continham elevada porcentagem de peptídeos maiores que 2100 Da, independentemente do GH. Nesta faixa são encontrados polipeptídeos (>2000) que não conseguem se proteger do ambiente aquoso e deixam expostos os aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, valina, leucina, fenilalanina e metionina) (Robert et al., 2015).

A conversão alimentar foi pior nos peixes que receberam dietas contendo o hidrolisado de sardinha com grau de hidrólise intermediário. Este resultado demonstra que não houve relação entre o grau de hidrólise e a conversão alimentar. Este hidrolisado contém alta porcentagem (75%) de peptídeos na faixa de peso de 5100-10.000 Da. A concentração dos peptídeos numa única faixa pode ter ocasionado uma saturação dos sítios de ligações que envolvem esta faixa de peptídeos, diminuindo a absorção (Aksnes et al., 2006; Zheng et al., 2012). Uma distribuição mais homogênea resulta em melhores resultados (Ha et al., 2018). Nos outros tratamentos os peptídeos estavam melhor distribuídos entre as faixas. Outros trabalhos são necessários para entender isto melhor.

Os hidrolisados não afetaram a composição de carcaça e os aspectos sanguíneos dos peixes. Os parâmetros sanguíneos mantiveram-se dentro do normal para a tilápia (Bittencourt et al., 2003). A redução no consumo das dietas contendo hidrolisado provocou alterações metabólicas nos peixes. Houve redução nas reservas de glicogênio, que em situações de restrição alimentar são utilizadas como fonte energética para manter os níveis de glicose no plasma (Walton, 1985; Suarez; Mommsen, 1987). Resultados semelhantes foram observados em estudos para outras espécies (Foster; Moon, 1991; Soengas et al., 1996; Alho, 2015). Da mesma forma, houve diminuição da proteína no músculo, devido ao menor consumo das dietas

contendo hidrolisados. Quando a quantidade de alimento consumida é inferior às necessidades normais, ocorre o catabolismo de aminoácidos para produção de energia (Beitz, 1996). A glicina e histidina são os aminoácidos mais abundantes no tecido muscular e são largamente utilizados durante o jejum nos peixes (Bombardeli et al., 2003).

O fornecimento dos hidrolisados reduziu a peroxidação e a resposta antioxidante. A diminuição da peroxidação pode ser resultado de um incremento na resposta antioxidante, mas também pode estar ligada a quantidade de nutrientes ingerida. A digestão dos nutrientes é um processo que libera radicais livres, e a menor peroxidação pode ser resultado no menor consumo das dietas contendo hidrolisado. Este menor consumo também limitou a quantidade de aminoácidos ingeridos, o que pode ter interferido no NPSH. A maior disponibilização de substrato aumenta a biossíntese do NPSH (Meister, 1989), que é uma medida indireta da glutathiona reduzida (Ellman, 1959) que é formada por glutamato, cisteína e glicina (Dandapat et al., 2000).

A concentração de bactérias heterotróficas diminuiu nos peixes que receberam dietas contendo os hidrolisados com GH intermediário e baixo. As bactérias heterotróficas totais englobam diversas bactérias, entre elas, bactérias lácticas e vibrionáceas. Como não houve alteração na concentração de lactobacilos a variação nas heterotróficas pode estar relacionado a diminuição concentração das bactérias vibrionáceas. Embora isso não demonstre um efeito prebiótico como observado anteriormente em outro estudo (Ha et al., 2018), isso pode indicar uma possível modulação da microbiota intestinal. Não se pode descartar que a menor população de bactérias pode ser também reflexo da diminuição do consumo de ração nesses tratamentos.

3.5 Conclusão

Os hidrolisados proteicos de sardinha apresentaram predominância de peptídeos de elevada massa molecular, entretanto, com a distribuição dos peptídeos de pesos moleculares diferentes. Os hidrolisados foram pouco palatáveis, afetando o crescimento e as reservas metabólicas das tilápias. A hematologia e bioquímica do sangue não foram afetadas. As dietas com inclusão de hidrolisado afetaram a população microbiana, o que indica a possibilidade de se usar este ingrediente para modular as populações intestinais.

3.6 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

3.7 Referências bibliográficas

- Adler-Nissen, J. (1986). Enzyme hydrolysis of food proteins. England: Elsevier Applied Science Publishers 427p.
- Aksnes, A., Hope, B., Jonsson, E., Bjornsson, B. T., & Albrektsen, S. (2006). 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*, 261, 305–17.
- Alho, B. G. (2015). Crescimento compensatório e metabolismo energético do tambaqui *Colossoma macropomum* submetidos a diferentes períodos de restrição alimentar. 38 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande/RS.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 17th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2000.
- Azambuja, C. R., Mattiazzi, J., Riffel, A. P. K., Finamor, I. A., Garcia, L. de O., Heldwein, C. G., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Llesuy, S. F. (2011). Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture*, 319, 156–161. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.06.002
- Beitz, D. C. (1996). Metabolismo de proteínas e aminoácidos. In: Swenson, M. J., & Reece, W. O. Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (p. 430-446).
- Berge, G. M., & Storebakken, T. (1996). Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145, 205–212.
- Blaxhall, P. C., & Daisley, K. W. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5, 771-781.
- Bittencourt, N. L. R., Molinari, L. M., Scoaris, D. D. O., Pedroso, R. B., Nakamura, C. V., Nakamura, T. U., Filho, B. A. A, & Dias Filho, B. P. (2003). Hematological and biochemical values for Nile tilapia *O. niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scientiarum*, 25, 385-389.
- Bogwald, J., Dalmo, R. O. Y., Leifson, R. M., Stenberg, E., & Gildberg, A. (1996). The stimulatory effect of a muscle protein hydrolysate from Atlantic cod, *Gadus morhua* L., on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(1), 3-16.
- Bombardelli, R. A., & Meurer, F., M. A. (2003). Metabolismo protéico em peixes. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.*, 7, 69-79.

- 419 Boyd, C. E. (1998). Water quality for pond aquaculture. Ala. Agr. Exp. Sta., Auburn Univer.,
420 Ala. 39 p.
- 421 Broggi, J. A., Wosniak, B., Uczay, J., Pessatti, M. L., & Fabregat, T. E. H. P. (2017).
422 Hidrolizado proteico de resíduo de sardinha como atrativo alimentar para juvenis de jundiá.
423 Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 69 (2), 505-512.
- 424 Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In: Enzymology, S.F.; L. P.
425 B. T. M. in (Ed.), Biomembranes – Part C: Biological Oxidations. Academic Press. (pp.
426 302-310).
- 427 Bui, H. T. D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M., & Lee, K. J. (2014). Growth performance,
428 feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red
429 seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture,
430 418-419, 11-16.
- 431 Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein
432 hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and
433 applications: A review. Food Chemistry, 135, 3020–3038.
- 434 Dandapat, J., Chainy, G.B., & Rao, K.J. (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant
435 defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem.
436 Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 127, 101–15. doi:10.1016/S0742-8413(00)00132-8
- 437 Dubois, M. G., Gilles, K. A, Hamilton, J. K., Roberts, P. A, & Smith, F. (1956). Colorimetric
438 method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350-358.
- 439 Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics,
440 82(1), 70-77.
- 441 Foster, D. G., & Moon, T. W. (1991). Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca*
442 *flavescens*): A study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. Physiol. Zool.,
443 Chicago, 64(1), 259-275.
- 444 Furuya, W. M. (2010). Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM. (pp. 79-
445 82).
- 446 García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A.,
447 & Guadiz, E. M. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from
448 discarded Mediterranean fish species. Food Res. Int., 65, 469-476.
449 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.061>.
- 450 Gildberg, A., Johansen, A., & Børgwald, J. (1996). Growth and survival of Atlantic salmon
451 (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid
452 bacteria during a challenge trial with *Aeromonas almonica*. Aquaculture, 138, 23–34.

- Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E., & Brosious, E. (1971). Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 56, 35-39.
- Ha, N., Jesus, G. F. A., Gonçalves, A. F. N., Oliveira, N. S., Sugai, J. K., Pessatti, M. L., Mouriño, J. L. P., & Fabregat, T. E. H. P. (2018). 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*, 500, 99–106.
- Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *J Funct Foods*, 2, 1–9
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., & Hayes, K. D. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *J. Food Sci.*, 74, C126–C133.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43–81.
- Leduc, A., Hervya, M., Rangamac, J., Delépéed, R., Fourniera, V., & Henry, J. (2018). Shrimp by-product hydrolysate induces intestinal myotropic activity in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 497, 380–388.
- Liang, M., Wang, J., Chang, Q., & Mai, K. (2006). Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). *Aquaculture Research*, 37, 102-106.
- Meister, A. (1989). Metabolism and function of glutathione, in: Dolphin, D., Poulson, R., & Avramovic, O. (Ed.), *Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*. John Wiley and Sons, New York, NY. (pp. 367–474).
- Natt, M. P., & Herrick, C. A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31, 735-738.
- Nilsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Food Chem. Toxicol.*, 66, 642-646.
- Refstie, S., Olli, J. J., & Standal, H. (2004). 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*, 239, 331–349.
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, Gildas, Bernay, B., & Henry, J. (2015). Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis*

- 487 *niloticus*) by-products hydrolysate and *in vitro* evaluation of antibacterial activity. Process
488 Biochemistry, 50, 487–492.
- 489 Schagger, H. (2006). Tricine-sds-page. Nature protocols, 1, 16.
490 <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- 491 Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, A., & Chotikachinda, R. (2014). Effects
492 of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive
493 capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. Aquaculture, 428-429, 195-202.
494 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.004>.
- 495 Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. J AOAC Int, 9(4), 914–31.
- 496 Shahidi, F., & Janak Kamil, Y. V. A. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and
497 their application in the food industry. Trends Food Sci Technol, 12, 435–64.
- 498 Siddik, M. A. B., Howieson, J., Ilham, I., & Fotedar, R. (2018). Growth, biochemical response
499 and liver health of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) fed fermented and nonfermented
500 tuna hydrolysate as fishmeal protein replacement ingredients. PeerJ, 6, 4870.
501 <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4870>.
- 502 Soengas, J. L., Strong, E. F., Fuentes, J., Veira, J. A. R., Andrés, M. D. (1996). Food deprivation
503 and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and
504 ketone bodies metabolism. Fish Physiol. Biochem., 15(6), 491- 511.
- 505 Spies, J. R. (1957). Colorimetric procedures for amino acids. In: B. T. M. in Enzymology (Ed.)
506 3, pp. 467-477. CHAP, Academic Press.
- 507 Srichanun, M., Tantikitti, C., Kortner, T. M., Krogdahl, A., & Chotikachinda, R. (2014). Effects
508 of different protein hydrolysate products and levels on growth, survival rate and digestive
509 capacity in Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch) larvae. Aquaculture, 428-429, 195-202.
- 510 Suarez, R. K., & Mommsen, T. P. (1987). Gluconeogenesis in teleost fishes. Can. J. Zool., 65,
511 1869-1882.
- 512 Swanepoel, J. C., & Goosen, N. J. (2018). Evaluation of fish protein hydrolysates in juvenile
513 African catfish (*Clarias gariepinus*) diets. Aquaculture, 496, 262–269.
- 514 Tacon, A.G.J. (1990). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – A training manual.
515 The essential nutrients. Brasília: FAO 117p.
- 516 Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., & Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based
517 on indophenol formation with sodium salicylate. Water Research, 12(6), 399-402.
- 518 Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bubmann, B., & Beermann, C. (2016). Detection of
519 antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout
520 by-products with trout pepsin. Food Chemistry, 205, 221–228.

- Walton, M. J. (1985). Aspects of amino acid metabolism in teleost fish. In: Cowey, C. B., Mackie, A. M., & Bell, J. G. Nutrition and Feeding in Fish. New York: Academic Press, (pp. 47-68).
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Haematol.*, Leipzig, 51, 32-49.
- Wosniak, B., Melim, E.W.H., Ha, N., Uczay, J., Pilatti, C., Pessatti, M.L., & Fabregat, T.E.H.P. (2016). 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*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44, 957-966.
- Xu, H., Mu, Y., Zhang, Y., Li, J., Liang, M., Zheng, K., & Wei, Y. (2016). Graded levels of fish protein hydrolysate in high plant diets for turbot (*Scophthalmus maximus*): effects on growth performance and lipid accumulation. *Aquaculture*, 454, 140–147.
- Zamora-Sillero, J., Kütter, M. T., Tesser, M. B., Monserrat, J. M., & Prentice, C. (2018). Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12835>
- Zheng, K.; Liang, M.; Yao, H.; Wang, J.; & Chang, Q. (2012). Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Nutrition*, 18, 297-303.
- Zheng, K., Xu, T., Qian, C., Liang, M., & Wang, X. (2013). Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. *Aquac. Nutr.*, 20, 372-380.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos mostraram que os hidrolisados proteicos de pescado são promissores para a sua aplicação na alimentação de animais como fontes de aminoácidos essenciais ou nitrogênio e como fonte de peptídeos bioativos. Apesar dos conhecimentos sobre os efeitos biológicos dos HPP estarem cada vez vastos, ainda há muitas perguntas a serem respondidas, requerendo mais pesquisas sobre o tema. Mais estudos são necessários sobre os melhores níveis de inclusão, graus de hidrólise, composição e sequência de aminoácidos, tamanho de peptídeos dos HPP e as melhores combinações destas características, permitindo o desenvolvimento de formulações de rações específicas para cada espécie e assim, minimizando os riscos de lixiviação de peptídeos e aminoácidos livres. Os presentes trabalhos mostraram que a combinação dos fatores, como espécie de peixe utilizada para o experimento, graus de hidrólise diferentes em cada hidrolisado e nível de inclusão, podem ter interferido nos resultados que foram diferentes entre os trabalhos.