

JULIETT DE FÁTIMA XAVIER DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO
PROVENIENTES DE RESÍDUOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Recife-PE
Fevereiro, 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO
PROVENIENTES DE RESÍDUOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

Juliett de Fatima Xavier da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Co-Orientadora: Profa. Dra. Karina Ribeiro

Recife - PE
Fevereiro, 2010

Ficha catalográfica

S586p Silva, Julieta de Fátima Xavier da
Produção e caracterização de hidrolisado protéico
provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) /
Julieta de Fátima Xavier da Silva. – 2010.
75 f. : il.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiro e
Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Pesca e Aqüicultura, Recife, 2010.
Inclui referências e anexo.

1. Hidrolisado protéico de Peixe 2. Resíduo de pescado
3. Proteases I. Bezerra, Ranilson de Souza, orientador
II. Título

CDD 639

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADO PROTÉICO
PROVENIENTES DE RESÍDUOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

JULIETT DE FATIMA XAVIER DA SILVA

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura** e aprovada em 26/02/2010 pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, em sua forma final. A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata **JULIETT DE FATIMA XAVIER DA SILVA** como **APROVADA COM DISTINÇÃO**.

COORDENADOR DO PPG-RPAq
Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra - Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia – Membro interno
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Karina Ribeiro - Membro externo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira – Membro externo
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

“Na escola da vida não se paga matrícula e o grande mestre, é o tempo”.

Cora Coralina

Dedicatória

Ao meu filho Pedro Veras Xavier, razão da minha vida.

Agradecimentos

A Deus que me dá saúde e força para enfrentar os percalços da vida.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra e a Prof. Dra. Karina Ribeiro pela dedicação na orientação deste trabalho;

Ao Professor Eudes Correia, a quem recorro quando preciso e sempre tira minhas dúvidas.

Aos Docentes do Curso de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura pela transferência de conhecimento e vivências durante as aulas ministradas.

Às funcionárias Selma e Telma da UFRPE pelos grandes favores prestados durante o curso do Mestrado, bem como aos funcionários da UFPE João Virgínio, Otaviano Tavares e ao técnico do Dept. de Bioquímica (UFPE), Albérico Espírito Santo.

Aos meus familiares, especialmente, ao meu marido Jonas Neto, minhas queridas tias Maria Hosana e Maria do Rosário e minha mãe Maria de Fátima, que cuidaram do meu filho na minha ausência e sempre torceram por mim;

A amiga de longas datas Suzan Diniz, por todo apoio nos momentos difíceis, pela consideração e por ter me incentivado a ingressar no Mestrado.

Aos amigos João Laurindo, Nivaldo Melo e Weruska Costa pelos materiais de estudo que contribuíram muito para a minha aprovação no Mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia (LABENZ): Amanda, Anderson, Augusto, Caio, Carolina, Dárlío, Diego, Douglas, Fábio, Fernanda, Gilmar, Helane, Janilson (em especial, por toda ajuda e consideração), Juarez, Juliana, Karina, Karoll, Kelma, Marina, Mirella, Moisés, Patrícia, Renata, Ricardo, Robson, Suzan, Talita, Thiago, Vagne, Werlayne e ao Prof Dárlío Teixeira pelo convívio, auxílio nas etapas experimentais e sugestões para o aprimoramento dos conhecimentos científicos;

Aos colegas da turma de Recursos Pesqueiros e Aquicultura 2008: Alexandre, Ana Lia, Anailza, Bruno O., Bruno M., Carla, Cezar, Emanuel, Elvídio, Fabrício, Fredy, Hosana, Isabela, Janilson (em especial, por sermos orientados pelo mesmo professor e por ser meu parceiro em todas as horas), Lucas, Luciano, Mirna, Paulo, Suziane e Thales pela convivência, troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração nas horas vagas.

OBRIGADA a todos!

RESUMO

Com a intensificação da piscicultura no Brasil, o cultivo de tilápia tem sido expressivo, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. A instalação de unidades de processamento de filé foi impulsionada pelo crescimento das exportações deste produto de alto valor comercial, que pode render mais de 30% do peso do animal. O restante é considerado resíduo sem valor comercial (resquícios de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras) que, ao serem descartados sem tratamento, representam grave problema ambiental. Entretanto, carcaça é um material rico em proteína enquanto que as vísceras são fontes de enzimas digestivas, entre elas as proteases, que podem ser utilizadas na indústria de alimentos e na produção de hidrolisado protéico. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar hidrolisado protéico de peixe a partir de autólise enzimática, bem como comparar seu desempenho com uma enzima comercial. Para tanto, foram utilizadas as seguintes fontes de enzimas: extratos brutos de intestino com concentrações de 100 e 600 mg/mL e um extrato com alcalase comercial a 0,5%. Todos os extratos tiveram suas atividades proteolíticas e concentrações protéicas determinadas. Posteriormente produziram-se três hidrolisados protéicos de peixe (n = 3), dois por autólise (HPP₁₀₀ e ₆₀₀) enzimática e outro com alcalase (HPP_{com}). O grau de hidrólise (GH) foi calculado com base na concentração de peptídeos TCA solúveis e ao final de 4 horas o GH do HPP₆₀₀ foi de 61,82%, do HPP_{com} de 44,66% e do HPP₁₀₀ de 28,40%. Uma alíquota do último tempo de hidrólise de cada hidrolisado foi aplicada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e os pesos moleculares observados foram estimados entre 116,25 e 37,41 KDa. As atividades enzimáticas foram comprovadas mediante zimograma. A composição centesimal revelou que a carcaça da tilápia possui 423,60 g/kg de proteína bruta e os HPP_{com}, ₁₀₀, e ₆₀₀ possuem 584,80; 407,00 e 508,20 g/kg, respectivamente. A composição de aminoácidos, assim como o perfil de ácidos graxos essenciais, evidenciaram suprir os requerimentos nutricionais de camarões carnívoros e onívoros na fase juvenil. Os dados obtidos demonstram que as proteases atuaram nas hidrólises e os HPP produzidos por autólise possuem características compatíveis para ser empregada na produção de alimentos para organismos aquáticos.

Palavras-chaves: hidrolisado protéico de peixe, resíduo de pescado, proteases, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

With the intensification of fish farming in Brazil the cultivation of tilapia has been expressive, mainly in the Northeast and Southeast. Due to the growth of exports, it had pushed up the installation of processing units fillet because of their high commercial value can yield more than 30% of the weight of the animal. The rest is considered waste of no commercial value (meat remains, head, skin, bones, scales and viscera) which had to be discarded without treatment, represent a serious environmental problem. However, carcasse is a rich material protein while, visceras is a source in digestive enzymes, including proteases, which can be used in the food industry and the production of protein hydrolysates. Thus, the objective of this study was to produce and characterize fish protein hydrolysate by enzymatic autolysis, and compare its performance with a commercial enzyme. For this, the following enzymatic sources were used: crude extracts of intestine with concentrations of 100 and 600 mg / mL and an extract with commercial alcalase to 0,5% (v/v). All extracts had their proteolytic activities and protein concentration determined. Later, three fish protein hydrolysates were produced (n = 3), by two autolysis (FPH₁₀₀ and ₆₀₀) and another enzyme with alcalase (HPP_{com}). The degree of hydrolysis (DH) was calculated as the soluble peptides concentration after TCA precipitation. In the end of 4 hours the GH of FPH₆₀₀ was 61, 82% of HPP_{com} was 44,66% and FPH₁₀₀ was 28,40%. An aliquot of the last time of hydrolysis of each hydrolysate was applied in SDS-PAGE and the molecular weights were estimated to be 116,25 and 37,41 kDa. Enzymatic activities were demonstrated by zymogram. The centesimal composition showed that the carcass of tilapia has 423.60 g/kg crude protein and FPH_{com, 100}, and ₆₀₀ have 584,80; 407,00 and 508,20 g/kg, respectively. The amino acid composition, as well as the profile of essential fatty acids, showed to supply the nutritional requirements of carnivorous and omnivorous shrimp in the juvenile phase. These data showed that the proteases acted on the hydrolysis and FPH produced by autolysis have characteristics to be used in the production of feed for aquatic organisms.

Keywords: fish protein hydrolysate, fish processing waste, proteases, *Oreochromis niloticus*

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
Resumo.....	29
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos.....	31
3. Resultados e discussão.....	35
4. Conclusões.....	42
Agradecimentos.....	42
Referências.....	42
Tabelas.....	47
Figuras.....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7. ANEXO.....	65
7.1 Normas da revista LWT Food Science and Technology.....	65

LISTA DE TABELAS

	Página
Revisão	
Tabela 1 - Enzimas usadas em hidrólise enzimática de proteínas.....	22
Artigo	
Tabela 1. Atividades proteolíticas das enzimas que atuaram nos hidrolisados protéicos de peixe (HPP).....	46
Tabela 2: Comparação da composição centesimal e valor calórico dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP) e carcaça de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) com farinha de peixe.....	47
Tabela 3. Comparação dos aminoácidos totais dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP) e outros ingredientes usados em alimentos para organismos aquáticos.....	48
Tabela 4 - Escore químico de aminoácidos das proteínas estudadas e da farinha de peixe.....	49
Tabela 5 – Comparação da composição dos ácidos graxos dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP).....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1 – Tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	14
Revisão	
Figura 2 – Procedimento para a obtenção do hidrolisado protéico de peixe (<i>Colossoma macropomun</i>) (BEZERRA, 2000).....	23
Artigo	
Figura 1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE dos hidrolisados protéicos de peixe. No poço 1 (padrão de peso molecular), no poço 2 (controle), no poço 3 (HPP _{com}), no poço 4 (HPP ₁₀₀), no poço 5 (HPP ₆₀₀) e zimograma em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE. No poço 1 (extratos de 600 mg/mL), no poço 2 (extrato de 100 mg/mL) e no poço 3 extrato com alcalase a 0,5%.	51
Figura 2 – Grau de hidrólise, dos hidrolisados protéicos de peixe (■ HPP _{com} , R ² = 0.97708), (• HPP ₁₀₀ , R ² = 0.95775) (▲ HPP ₆₀₀ R ² = 0.98462).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

BAPNA - benzoil arginina ρ -nitroanilida

GH – Grau de hidrólise

HPC – Hidrolisado protéico de camarão

HPP – Hidrolisado protéico de peixe

KDa - quilo Daltons

LEUPNAN - aminoacil de β naftilamida

pH - potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS

SUCPHEPNAN - succinil fenilalanina ρ –nitroanilida

SAPNA - N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

TCA - Ácido Tricloroacético

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda por produtos pesqueiros tem resultado em um constante crescimento da produção aquícola mundial. Em 2006, foram produzidos aproximadamente 144 milhões de toneladas de pescado, das quais 92 milhões foram oriundos da pesca e cerca de 52 milhões, da aquicultura. Sendo aproximadamente 110 milhões destinados ao consumo humano e 33 milhões a produção de farinha e óleo de peixe (FAO, 2008). Embora em termos percentuais a captura de organismos aquáticos ainda seja responsável por cerca de 63% do total de pescado fornecido, essa atividade vem apresentando estabilidade desde a década de 80. Segundo dados da FAO (2008), no período de 2002 a 2006, a captura diminuiu de 93 para 92 milhões de toneladas, enquanto que a aquicultura cresceu 30%, passando de 40 para 52 milhões de toneladas, sendo o cultivo de tilápias um dos responsáveis por esse crescimento. A tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) é uma das espécies de peixe de água doce mais cultivada no mundo. Sua produção mundial aumentou de aproximadamente 0,4 milhões de toneladas em 1991 para 2,3 milhões de toneladas em 2006. Gerando assim um incremento de US\$ 0,6 bilhões para mais de US\$ 2,7 bilhões (FAO, 2008).



Figura 1 – Tilápia (*Oreochromis niloticus*) Foto (Silva, J.F.X.)

No Brasil, segundo dados fornecido pelo IBAMA (2008), a aquicultura continental produziu cerca de 0,2 milhões de toneladas em 2007 o que representou 19,6% da produção de

pescado total do país, sendo a tilápia a principal espécie cultivada. Em 2007, a produção de tilápia foi de aproximadamente 95.000 toneladas, sendo os principais produtores os Estados do Ceará, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (IBAMA, 2008). A tilapicultura firmou-se como atividade empresarial no Brasil a partir de 1980, quando surgiram os empreendimentos pioneiros. O crescimento dessa atividade no Brasil, principalmente, das exportações, para países como os Estados Unidos e Canadá, impulsionou a instalação de unidades de processamento, além de despertar o interesse de investidores nacionais.

O filé é o item de maior valor econômico, e seu rendimento varia de acordo com o tamanho dos peixes e com o domínio tecnológico das empresas processadoras e. Assim seu rendimento pode atingir entre 30 e 40% do peso do animal sendo o restante considerado resíduo e sem valor comercial (restos de carne, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras). Desta forma, os resíduos da industrialização da tilápia, que representam de 60 a 70% da matéria-prima são atualmente subutilizados ou descartados pelas indústrias de filetagem ocasionando danos ao meio ambiente. Preocupados com problemas ambientais, pesquisadores em todo o mundo vem desenvolvendo métodos que possibilitem a transformação desses resíduos em produtos tanto para a nutrição humana, quanto para animal (Martone et al., 2005).

A farinha de peixe compreende de 20 a 60% das rações para organismos aquáticos. A substituição desta fonte tradicional de proteína, por alimentos alternativos, é uma forma de utilização de resíduos industriais, importante para a redução dos custos de produção. Uma vez que se estimam os gastos com alimentação como sendo responsáveis por 40 a 50% do custo total da produção, visto que a proteína é o nutriente mais caro da dieta. Dentre os produtos obtidos através da transformação desses resíduos destacam-se os hidrolisados protéicos de peixes que possuem boa qualidade nutricional, sendo assim, potenciais substitutos para a farinha de peixe em rações para organismos aquáticos, que apesar de ser a principal fonte protéica inserida em rações, possui oferta limitada, demanda crescente, variabilidade da disponibilidade e constante flutuação nos preços, o que pode afetar a sustentabilidade e

rentabilidade da aqüicultura. Essa possível substituição passa a ser uma alternativa vantajosa para a indústria de rações e para os aquicultores, além de minimizar os impactos ambientais.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de resíduo do processamento da tilápia *Oreochromis niloticus* como fonte protéica e enzimática na produção de hidrolisado protéico de peixe (HPP).

2.2 Objetivos específicos

- Obter proteases a partir de extratos brutos do intestino de tilápias;
- Determinar a concentração de proteína e atividade proteolítica dos extratos brutos;
- Produzir o hidrolisado protéico a partir de resíduos do processamento da tilápia por autólise enzimática e com o uso de uma enzima comercial;
- Definir o perfil temporal de hidrólise protéica dos HPP utilizando duas fontes enzimáticas;
- Obter o perfil eletroforético da hidrólise das proteínas presentes nos HPP;
- Obter o perfil nutricional dos HPP, mediante análise bromatológica, composição de aminoácidos, ácidos graxos e colesterol.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A farinha de peixe é amplamente empregada na aquicultura, sendo a principal fonte protéica nas rações para a maioria das espécies cultivadas, principalmente por apresentar bom perfil de aminoácidos, ácidos graxos essenciais, energia digestível, minerais e vitaminas, além de conferir melhor palatabilidade às rações (FARIA et al., 2001) Anualmente são produzidas de 5 a 7 milhões de toneladas de farinha de peixe em todo mundo, sendo 60% direcionado para o uso na aquicultura e o restante é consumido em rações para aves e suínos (FAO, 2008). Tal fato exige, em média, cerca de 28 milhões de toneladas de pescado *in natura*, volume equivalente a aproximadamente 30% da atual produção pesqueira (92 milhões de toneladas em 2006) (FAO, 2008). A FAO (2005) prevê um aumento ao redor de 1% ao ano na demanda por farinha e óleo de peixe até 2010 e de 0,5% ao ano, entre 2010 e 2015. Com isso a demanda por pescado para sua produção deverá ser próxima de 35 milhões de toneladas. Esse crescimento será estimulado principalmente com a expansão da aquicultura, bem como, pela produção de frangos e suínos.

No entanto, a aquicultura mundial deve buscar reduzir sua dependência quanto ao uso de farinha de peixe, pois além de sua qualidade ser, algumas vezes, duvidosa, a variação no volume de captura de pescado pode gerar redução na sua oferta e custo elevado do produto. Estes entraves promovem limitações ao uso da farinha de peixe em rações e vem motivando a busca por potenciais substitutos à mesma (FARIA et al., 2001).

Diversos produtos têm sido utilizados com o propósito de substituir total ou parcialmente a farinha de peixe em rações aquáticas, incluindo subprodutos de pescado ou de animais terrestres, sementes oleaginosas, plantas aquáticas, concentrados protéicos, proteína de organismos unicelulares e subprodutos de leguminosas e cereais (ALAM et al., 2005). Estudos recentes vêm demonstrando a viabilidade da substituição total da farinha de peixe por fontes protéicas de origem vegetal em rações para truta salmonídeos e outros peixes

originalmente carnívoros, inclusive algumas espécies marinhas. Até mesmo rações para camarões podem ser produzidas sem o uso de farinhas de peixe. Entretanto é importante que o balanceamento em energia, aminoácidos e ácidos graxos essenciais e fósforo disponível seja mantido com a inclusão de ingredientes alternativos naturais ou sintéticos (DAVIS e ARNOLD, 2000).

O farelo de soja tem sido preconizado como a principal fonte protéica de origem vegetal em rações para peixes (FURUYA et al., 2001a). Embora possua alto teor de proteína e um bom perfil de aminoácidos, seu nível de metionina é baixo, contém aproximadamente 30% de carboidratos indigestíveis e vários compostos ou fatores antinutricionais que podem prejudicar os processos digestivos (HERNÁNDEZ et al., 2006). Assim, a utilização desse produto em rações animais exige um adequado processo de fabricação (FURUYA et al., 2001b). De forma geral, a viabilidade da substituição da farinha de peixe por ingredientes vegetais estará condicionada ao hábito alimentar do animal a ser cultivado.

O grau de inclusão de fontes protéicas vegetais em rações aquícolas parece ser limitado pela presença de fatores antinutricionais, associada à deficiência em aminoácidos essenciais (FRANCIS et al., 2001) e à disponibilidade do fósforo. Visto que, nos alimentos de origem vegetal, cerca de 70% deste mineral está complexado na forma de fitato, que não é utilizado pelos monogástricos e que promove também a redução na disponibilidade de outros elementos, como zinco, cálcio, ferro e manganês (FARIA et al., 2001). Com relação aos teores de fibras indigeríveis, Olvera-Nova et al. (1997) e Fonseca (2004) recomendam o uso de concentrados protéicos como uma forma de eliminar as fibras indigeríveis do ingrediente integral, permitindo o uso de maiores níveis de materiais vegetais nas rações para peixes. Mente et al. (2002) demonstraram que os aminoácidos constituintes da proteína do peixe são particularmente importantes quando incorporados nas dietas contendo proteína vegetal.

Subprodutos da indústria pesqueira também vêm sendo estudados como alternativa na substituição da farinha de peixe. A produção de hidrolisado protéico a partir de resíduos das

indústrias de pescado representa uma excelente alternativa para o incremento da oferta de proteína animal (KLOMKLAO et al., 2005; CENTENARO, 2009), já que estes resíduos são usualmente descartados.

O hidrolisado protéico de peixe (HPP) é resultado da solubilização das proteínas do pescado. Estas proteínas podem ser obtidas a partir da hidrólise química (hidrólise ácida e alcalina) e por hidrólise enzimática através de enzimas de origem vegetal, animal ou microbianas adicionadas à matéria-prima a ser catalisada ou ainda por enzimas proteolíticas endógenas, ou seja, presentes no próprio organismo (KRISTINSSON e RASCO, 2000a; MARTONE et al., 2005).

A hidrólise ácida pode ser realizada com uso de ácidos inorgânicos, orgânicos ou por uma mistura de ambos. Os ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico, embora de baixo custo, têm a desvantagem de necessitar de neutralização, antes do alimento ser consumido (OETTERER, 2001). Este processo resulta em uma considerável quantidade de sal nos produtos, decorrente da adição de NaOH para sua neutralização, o que pode tornar o produto não palatável e interferir na funcionalidade dos alimentos. Outro inconveniente é a destruição do triptofano, que é um aminoácido essencial (HOLANDA, 2004).

A hidrólise alcalina é realizada com soluções de bases fortes, como NaOH e KOH, sob aquecimento e agitação, resultando em produtos com baixa funcionalidade, além de poder afetar o valor nutritivo dos hidrolisados protéicos (KRISTINSSON e RASCO, 2000a). As quatro reações químicas que descrevem o que ocorre com as proteínas quando se utiliza álcali (base) são: (1) hidrólise da ligação peptídica, (2) destruição de alguns aminoácidos (3) cross-linking e (4) racemização de resíduos de aminoácidos do L-aminoácidos para D-aminoácidos (HAYASHI e KAMEDA, 1980).

A hidrólise enzimática é um método baseado na adição de enzimas para clivagem das proteínas, sendo um processo usado para aperfeiçoar ou modificar as propriedades químicas, funcionais e sensoriais da proteína sem prejudicar o seu valor nutricional. O processo

enzimático ocorre sob condições brandas, sem produzir produtos de degradação, observados nas hidrólises ácida e alcalina. Este tipo de hidrólise oferece vantagens porque permite um bom controle do processo e, conseqüentemente, das propriedades dos produtos resultantes (FONKWE e SINGH, 1996, HOLANDA, 2004). O processo de hidrólise resulta na diminuição do peso molecular, aumento do número de grupos ionizáveis e exposição de grupos hidrofóbicos. Algumas apresentam especificidade para ligações peptídicas nas quais participam determinados aminoácidos, enquanto outras agem mais amplamente. De acordo com o mecanismo de ação, as enzimas (proteases) podem ser divididas em exopeptidases e as endopeptidases. As do primeiro grupo atuam próximo das extremidades das cadeias enquanto as outras atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (RAO et al., 1998), entre as endopeptidases encontram-se as principais proteases industriais como as tripsinas. Na indústria de alimentos, as proteases são usadas no processamento de diversos produtos, incluindo vinhos, cereais, leite e derivados, carne e produtos de peixe, e obtenção de flavorizantes (FURLAN e OETTERER, 2002).

Na Tabela 1 estão listadas algumas enzimas utilizadas em hidrólise protéica. Várias proteases comerciais são utilizadas para solubilizar proteínas de pescado, porém a alcalase, uma endopeptidase alcalina produzida pela fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*, tem sido intensivamente utilizada pela indústria por ser considerada uma das melhores enzimas para o preparo de hidrolisados, pois o produto apresenta gosto suave mesmo quando tem elevado grau de hidrólise (BENJAKUL e MORRISSEY, 1997; KRISTINSSON e RASCO, 2000a; CENTENARO et al. 2009).

Tabela 1 - Enzimas usadas em hidrólise enzimática de proteínas

PROTEASES	ORIGEM	pH de máxima atividade proteolítica	Temperatura (°C) de máxima atividade proteolítica
Microbriana			
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	6,5-8,5	55-70
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	5,5-7,5	45-55
Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	7,0-9,0	37
Animal			
Quimiotripsina	Bovina/suína	7,0-9,0	40
Pancreatina	Bovina/suína	7,0-9,0	40
Pepsina	Bovina/suína	2,0-4,0	40
Tripsina	Bovina/suína	7,0-9,0	40
Planta			
Bromelina	Caule do abacaxi	5,0-8,0	50-60
Ficina	Látex de figos	5,0-8,0	30-50
Papaina	Mamão	5,0-7,0	65-80

Fonte: Diniz e Martin (1999)

A hidrólise por autólise enzimática de pescado é um método alternativo, que objetiva a recuperação de proteínas de espécies subutilizadas ou de resíduos de processamento que seriam desperdiçados através do emprego das próprias enzimas proteolíticas para solubilização da proteína do pescado, resultando em duas frações: solúvel e insolúvel. A fração insolúvel contém proteínas não hidrolisadas e outros materiais insolúveis, já a fração solúvel é rica em proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres. Esse produto pode atingir uma concentração de proteína até 90%, além de apresentar propriedades funcionais úteis para a indústria alimentícia (OETTERER, 2001). Este material é uma potencial fonte de enzimas proteolíticas, que agrega valor ao resíduo proveniente do processamento do pescado (CAVALHEIRO et al., 2007). A autólise enzimática ainda é o método mais comum para a produção de hidrolisado protéico (ASPMO et al., 2005), pois a utilização de proteases das vísceras do próprio peixe traz uma vantagem sobre as enzimas comerciais relacionada aos custos de produção que podem ser bastante reduzidos. Por outro lado, o método torna-se menos controlável, pois o perfil e a atividade enzimática das proteases podem ser altamente sazonais em uma dada espécie de peixe e diferir entre as diversas espécies (BENJAKUL e MORRISSEY, 1997; KRISTINSSON e RASCO, 2000c). Para produzir um hidrolisado com

propriedades pré-determinadas, é importante primeiro conhecer o perfil de atividade das enzimas da víscera utilizada, visto que diferentes atividades podem levar à formação de diferentes frações de peptídeos, com diferentes propriedades físico-químicas.

O fluxograma para obtenção do hidrolisado protéico de pescado por hidrólise enzimática desenvolvido por Bezerra (2000) pode ser visto na Figura 2.

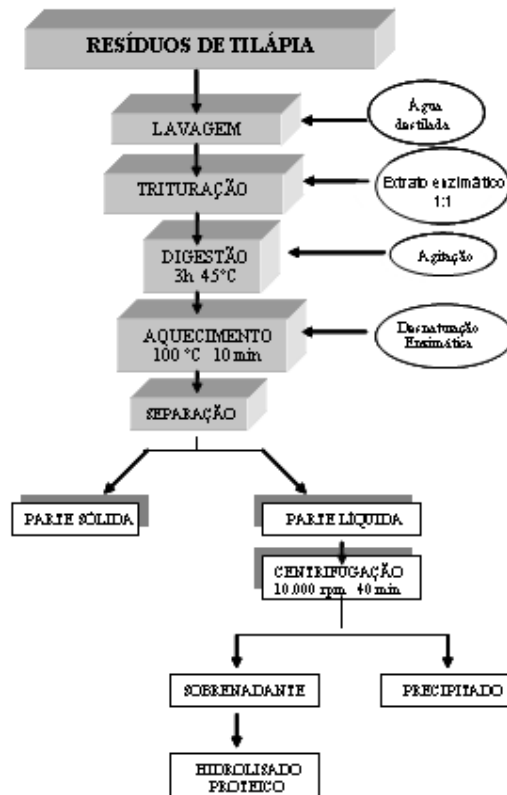


Figura 2 - Procedimento para a obtenção do hidrolisado protéico de peixe (*Colossoma macropomun*) (BEZERRA, 2000).

Um dos grandes entraves na produção do HPP é que a hidrólise de proteínas promove a formação de um sabor amargo no produto, o que ocorre devido à exposição do interior hidrofóbico das cadeias laterais dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptofano e tirosina (FURLAN e OETTERER, 2002). Entretanto, este sabor pode ser evitado através do controle do grau de hidrólise e da diminuição da quantidade de peptídeos amargos produzidos durante o tratamento enzimático (LIASET et al., 2003). O grau de hidrólise pode

ser controlado pela velocidade de quebra das enzimas e pela influência das características funcionais do produto final, como solubilidade, dispersibilidade, capacidade de retenção de água e emulsificação. Um aumento na relação enzima/substrato resultará, por exemplo, em uma diminuição do comprimento médio da cadeia de peptídeos na fração solúvel, diminuindo o sabor amargo no produto final (FURLAN e OETTERER, 2002). Existem vários métodos para medir o grau de hidrólise, variando em sua complexidade, precisão e exatidão, sendo eles: a medida de solubilidade em ácido tricloroacético (TCA), determinação do nitrogênio amino através da titulação com formaldeído, e reação com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) e pH-Stat (MAHMOUD, 1994; HOLANDA, 2004).

O HPP apresenta-se, tradicionalmente, na forma líquida, entanto para a indústria de ração é mais prático que o mesmo esteja na forma sólida. O “Spray-Dryer” é um dos equipamentos mais empregados na conversão do produto líquido para a forma de pó, com a vantagem adicional de ser de fácil manipulação e maior estabilidade, porém a temperatura empregada pode causar alguns efeitos na qualidade do produto final (ABDUL-HAMID et al., 2002). Estes autores demonstraram que a utilização do Spray-Dryer em temperaturas elevadas afeta, sobretudo, o conteúdo protéico, a umidade e o teor de todos os aminoácidos essenciais, exceto a metionina.

Modificar a proteína enzimaticamente usando uma mistura de enzimas proteolíticas selecionadas para quebrar ligações peptídicas específicas é uma prática comum na indústria alimentícia, mas sua aplicação em produtos de origem aquática, destinados ao consumo humano é ainda limitada (KRISTINSSON e RASCO, 2000b).

A maioria das pesquisas realizadas tem demonstrado tratar-se de uma excelente fonte de proteína, com bom valor nutritivo, podendo ser adicionado na elaboração de rações para alimentação de organismos aquáticos (BEZERRA, 2006) bem como adicionado em rações para o consumo animal, empregado, por exemplo, como substituto do leite no desmame de bezerros e leitões (BERGE e STOREBAKKEN, 1996). Outro ponto a ser considerado é alta

digestibilidade do produto, o que o faz ser indicado, na alimentação de larvas de peixes cultivados. Visto que nessa fase a maioria desses animais não apresenta o trato digestório morfológicamente diferenciado e a atividade enzimática presente é ainda incipiente (CARVALHO et al., 1997). As particularidades do sistema digestório das larvas indicam que proteínas parcialmente hidrolisadas podem ser melhor utilizadas e, como conseqüência, promover melhores taxas de crescimento e sobrevida (CAHU et al., 2004).

Sidwell et al. (1970) constataram que a suplementação de dietas com o concentrado protéico de peixe melhorou tanto o crescimento, quanto as funções biológicas de ratos desmamados e alimentados durante 28 dias com esta dieta. Wergedahl et al. (2004) demonstraram que a inclusão de hidrolisado na dieta de ratos reduziu o nível de colesterol total no plasma, aumentou a fração do colesterol HDL.

Além disso, observou-se que o HPP pode promover maior resistência às enfermidades observada nos animais domésticos que consomem o produto (VINOT et al., 1989; FURLAN e OETTERER, 2002). Ressaltando-se ainda seu uso em pulverização de cultivos de hortaliças, como o tomate, que reduz o estresse e melhora a sobrevivência da planta durante o transplante (WYATT e MCGOURT, 1990).

Até o presente não existem dados que possibilitem determinar com clareza qual espécie de pescado é mais adequada para ser usada no processo hidrolítico. A matéria-prima atualmente utilizada são os descartes comestíveis de processamento de pescado magro, visto que espécies com alto teor de gordura promovem o desenvolvimento de aromas intensos no produto elaborado (OETTERER, 2001). Em geral, o HPP possui conteúdo de aminoácidos essenciais similares ou até superior ao da proteína referência sugerida pela FAO. Testes biológicos de digestibilidade, como o REP (relação de eficiência protéica), comparam seu valor nutritivo ao da caseína do leite (DINIZ e MARTIN, 1999; OETTERER, 2001).

De acordo com Simpson e Haard (1984) e Nilsang et al (2005), os HPP podem ser considerados ótima fonte de lisina, arginina, glicina, alanina e prolina, que são importantes flavorizantes em produtos de crustáceos.

Goldhor e Regenstein (1988) enumeram várias características e/ou qualidades que o hidrolisado protéico apresenta na nutrição animal, como a melhora na palatabilidade de alimentos para animais monogástricos, como cães, gatos e salmonídeos; a melhoria na digestibilidade do alimento para animais muito jovens; a elevada solubilidade, que permite o controle do teor de óleo e de umidade do produto, além do alto teor protéico e baixo teor de cinza. Essa última característica é de suma importância no preparo de produtos destinados à aquicultura.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos do trabalho experimental dessa dissertação são apresentados no artigo intitulado “**Resíduo do processamento de peixes como matéria prima para a produção de hidrolisado protéico**” (manuscrito), que se encontra anexado e será submetido à Revista Animal Feed Science and Technology (ISSN: 0377-8401), após tradução para língua inglesa.

Resíduo do processamento de peixes como matéria prima para a produção de hidrolisado protéico

Juliatt F. X. Silva^a, Karina Ribeiro^b, Janilson, F. Silva^a, Marina Marcuschi^a, Ranilson S. Bezerra^a.

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

^bUniversidade Federal do Rio Grande do Norte.

Autor para correspondência

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

RESUMO

Os resíduos oriundos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) representam uma excelente fonte de proteína e protease. Desta forma, o enfoque do presente trabalho foi utilizar este material na produção de hidrolisado protéico de peixe (HPP). Assim, compararam-se três HPP: dois obtidos por autólise, utilizando extratos com concentrações de 100 (HPP₁₀₀) e 600mL (HPP₆₀₀) de intestino e outro com uma enzima comercial utilizando extrato de alcalase a 0,5% (HPP_{com}). Ao final de 4 horas de hidrólise, o grau de hidrólise do HPP_{com}, 100 e 600 foram 44,66%; 28,40% e 61,82%, respectivamente. O teor de proteína bruta da carcaça e dos HPP_{com}, 100 e 600 foram: 423,6gkg⁻¹; 584,8gkg⁻¹; 407,0gkg⁻¹ e 508,2gkg⁻¹, respectivamente. Analisando os escores químicos dos HPP observou-se que todos os produtos obtidos suprem as exigências de aminoácidos para camarões carnívoros e onívoros na fase juvenil. Conteúdos de ácidos graxos essenciais importantes para o crescimento destes animais foram identificados nos produtos obtidos. Os dados demonstram que os hidrolisados protéicos de peixe produzidos por autólise possuíram características compatíveis sua utilização na produção de alimentos para organismos aquáticos.

Palavras-chave: Hidrolisado protéico de peixe, Resíduo de processamento, *Oreochromis niloticus*, vísceras, proteases.

INTRODUÇÃO

A tilápia *Oreochromis niloticus* é uma das espécies de peixe de água doce mais cultivada no mundo. A produção mundial de tilápia aumentou de aproximadamente 0,4 milhões de toneladas em 1991 para 2,3 milhões de toneladas em 2006, promovendo um rendimento em torno de US\$ 0,6 bilhões para mais de US\$ 2,7 bilhões (FAO, 2008). No Brasil é a principal espécie de peixe cultivada, tendo ultrapassado a carpa e o tambaqui (IBAMA, 2008) e devido ao crescimento das exportações impulsionou-se a instalação de unidades de processamento. O filé da tilápia é o item de maior valor econômico. Seu rendimento pode chegar a 40% do peso do animal, sendo o restante considerado resíduo (resquícios de músculo, cabeça, pele, ossos, escamas e vísceras) sem valor comercial. Desta forma, os resíduos da industrialização da tilápia (60 a 70% da matéria-prima) são atualmente subutilizados ou descartados pelas indústrias de filetagem, ocasionando danos ao meio ambiente. Entretanto, este material representa uma fonte potencial de enzimas proteolíticas e proteínas.

A utilização de fontes protéicas de resíduos em substituição as proteínas tradicionais inseridas na ração é uma das formas de aproveitamento sustentável dos mesmos. Dentre os produtos obtidos através da transformação desses resíduos destacam-se os hidrolisados protéicos de peixes (HPP), produto obtido a partir do resultado da solubilização das proteínas do pescado no qual o processo de catalisação de enzimas proteolíticas consiste na quebra de longas cadeias de moléculas protéicas que resulta em frações solúveis e insolúveis. As frações insolúveis contêm proteínas não hidrolisadas e outros materiais insolúveis, já a fração solúvel é rica em proteínas, peptídeos e aminoácidos livres (Martone, Borla & Sanchez, 2005).

Dentre as enzimas utilizadas para a produção de HPP destaca-se a alcalase, protease bacteriana alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* e desenvolvida para a indústria de detergentes, entretanto de alto custo (Schmidt e Salas-Mellado, 2009). Porém a autólise

enzimática é um método que utiliza as proteases das vísceras do próprio peixe e traz vantagem sobre as enzimas comerciais devido aos custos de produção que podem ser bastante reduzidos.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo aproveitar os resíduos do processamento de tilápia e estabelecer uma fonte protéica alternativa, a partir da produção de hidrolisado protéico de peixe (HPP), e viabilizar sua utilização como componente de alimentos para organismos aquáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos exemplares

Espécimes de *O. niloticus*. foram obtidos de cultivos em tanques-rede, todos localizados no Estado de Pernambuco, Brasil. Os peixes foram acondicionados em gelo e transportados para o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco (LABENZ - UFPE). No laboratório os peixes foram pesados e medidos e apresentaram $924,43 \pm 206,78$ g e $34,55 \pm 1,89$ cm. Os exemplares foram filetados e obteve-se um rendimento médio de $35\% \pm 4,17$, após esse procedimento retirou-se o intestino, obtendo-se um peso médio de $18,77 \pm 4,84$ g. Os intestinos e as carcaças foram armazenados em freezer a -20 °C até o momento das análises.

Extrato enzimático

O material foi descongelado e os intestinos foram homogeneizados nas concentrações de 100 e 600 mg/mL (peso/volume) de tecido em água destilada. Para tanto, utilizou-se um homogeneizador de tecidos (IKA® RW 20 DIGITAL). O extrato bruto obtido foi coletado e armazenado em freezer a -20 °C para ser utilizado nos processos de hidrólise. A enzima comercial alcalase Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) a 0,5% foi adotada para comparação.

Dosagem de proteínas nos extratos brutos e hidrolisados protéico

O conteúdo protéico foi obtido a partir da mensuração da absorbância das amostras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda da faixa ultravioleta 260 e 280nm (Warburg e Christian, 1941) usando a equação:

$$[\text{proteína}] \text{ mg/mL} = A_{280\text{nm}} \times 1,5 - A_{260\text{nm}} \times 0,75 \text{ (Warburg et al., 1941)}$$

Ensaio enzimáticos

As atividades enzimáticas proteolíticas foram realizadas utilizando o BApNA 8mM (N α -benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida) como substrato específico para tripsina; SApNA 8mM (N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) e Suc-phe-*p*-Nan 8mM (succinil fenilalanina *p*-nitroanilida) como substratos específicos para quimotripsina; LEUPNAN 8mM (aminoacil de β naftilamida) como substrato específico para leucinaminopeptidase e azocaseína como substrato inespecífico.

Os ensaios com os substratos específicos foram realizados em triplicata, utilizando-se 30 μ L de cada substrato separadamente, 140 μ L de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 e 30 μ L da amostra. A mensuração das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro de microplaca (xMarktm BIORAD) a λ 405nm por 15 minutos a 25°C para o BAPNA e 10 minutos a 25°C para os demais substratos.

O ensaio para atividade inespecífica com substrato azocaseína (1% em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0) foi realizado em triplicata à temperatura ambiente (25°C). A reação enzimática consistiu da incubação de 30 μ L de amostra (extrato bruto) com 50 μ L do substrato azocaseína (1%), sendo conjuntamente realizados um branco de reação: 30 μ L de Tris-HCl 0,1M pH 8,0 com 50 μ L de substrato azocaseína (1%). A reação durou 60 minutos e foi interrompida com a adição de 240 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a adição do ácido esperou-se 15 minutos para centrifugar a mistura a 8.000 xg por 5 minutos. Após a centrifugação, 70 μ L do sobrenadante foi adicionado à 130 μ L de 1M NaOH em microplaca. E a mensuração da absorbância foi feita em espectrofotômetro de microplaca (xMarktm

BIORAD) a λ 450nm (BEZERRA et al., 2005). Para avaliar se houve diferença na hidrólise entre as enzimas com seus respectivos substratos os dados gerados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tuckey para comparação das médias. O programa estatístico utilizado foi o SIGMA STAT 3.5.

Preparação do hidrolisado protéico de peixe

Os hidrolisados protéicos de peixe foram produzidos por autólise enzimática e com uma enzima comercial (alcalase) todos sem ajuste de pH, de acordo com o método desenvolvido por Bezerra (2000) modificado.

Os resíduos (carcaça com exceção das vísceras) foram descongelados em temperatura ambiente, lavados com água filtrada e posteriormente foram triturados em liquidificador industrial junto aos extratos com alcalase a 0,5%, 100 e 600mg/mL e alcalase a 0,5% na proporção de 1:1, onde produziu-se o HPP_{com}, HPP₁₀₀ e HPP₆₀₀, respectivamente. A mistura foi colocada em um becker de vidro em banho-maria, com temperatura de 45°C onde permaneceu por 4 horas submetida a uma pequena agitação contínua para melhorar o contato enzima/substrato. Posteriormente o hidrolisado foi fervido a 100°C, durante 10 minutos, para desativação enzimática. No final do processo ocorreu separação das partes sólida e líquida através de uma peneira com malha de 1mm². Os HPP foram acondicionados em recipientes para posteriores análises. Durante o processo de hidrólise foram colhidas 1 ml de amostras em triplicata nos tempos 0 (carcaça + água), 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos, onde ao final de cada coleta as amostras e o restante da solução foram fervidas a 100°C, durante 10 minutos, para desativação enzimática. No total foram coletadas 99 amostras de cada hidrolisado.

Determinação do perfil temporal de hidrólise

Foram retirados uma alíquota de 50 µL de cada amostra e adicionado 150 µL de TCA, após 15 minutos, as mesmas foram centrifugadas a 8000 xg por 5 minutos. O sobrenadante das amostras do HPP_{com} e HPP₆₀₀ foram diluídas 50 vezes e do HPP₁₀₀ 25 vezes. O mesmo ensaio foi feito com água (substituindo o TCA) que serviu como controle. A absorbância das amostras diluídas foi mensurada nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e a concentração de peptídeos ou proteína no sobrenadante foi calculada segundo a metodologia de Warburg et al. (1941). Com base na concentração de peptídeos TCA solúvel foi possível então calcular o percentual de proteína hidrolisada em cada tempo da reação, utilizando-se a seguinte fórmula:

[Proteína hidrolisada no tempo X (%)] = 100 x [(A-B)/C], onde:

A = Concentração total de peptídeos no tempo X (amostra + TCA).

B = Concentração total de peptídeos no tempo “0” (amostra tempo 0 + TCA).

C = Concentração total de proteína solúvel no tempo X (amostra + água).

Estes dados possibilitaram o desenho de curvas temporais de hidrólise (tempo *versus* percentual de hidrólise) para cada reação. A partir da curva foi realizada uma análise de regressão não linear hiperbólica, utilizando-se o programa estatístico ORIGIN 6.0. Os parâmetros assintóticos obtidos foram os seguintes:

a) P1 - Percentual Máximo de Hidrólise (PMH), percentual máximo de proteína do substrato que as enzimas dos extratos são capazes de hidrolisar.

b) P2 - Tempo Médio de Hidrólise Máxima (TMHM), percentual relacionado ao tempo (min.) que a enzima leva para hidrolisar 50% do total que ela poderia hidrolisar.

Eletroforese e zimograma

Para a eletroforese e zimograma uma alíquota de 100 e 30 µg de proteína, respectivamente de cada hidrolisado no tempo 240 minutos foi liofilizada separadamente. Utilizou-se para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguindo metodologia

descrita por Laemmli (1970) e para o zimograma o mesmo gel seguindo metodologia descrita por García-Carreño, Dimes & Haard (1993). Para ambos o gel de concentração foi calculado a 4% e o gel de separação a 14%. O gel foi corado com uma solução composta de 0,01% de Azul brilhante de Coomassie, 25% de metanol e 10% de ácido acético e foi descorado em uma solução com a mesma composição, mas desprovida do corante.

Os pesos moleculares da proteína do hidrolisados foi estimado por comparação com um padrão de peso molecular (BIO-RAD) composto por miosina (205 kDa), B-galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), transferrina (80 kDa), BSA (66 kDa), glutamato dihidrogenase (55 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (21 kDa).

Análise bromatológica, composição de aminoácidos, ácidos graxos e colesterol

A análise da composição centesimal, composição de aminoácidos, ácidos graxos e colesterol dos hidrolisados protéicos de peixe foram realizadas no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL), Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco segundo os métodos utilizados pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). Foram mensurados os teores de umidade, carboidratos, proteína bruta, extrato etéreo, cinzas, fibra, valor calórico, aminoácidos essenciais (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), aminoácidos não essenciais (tirosina, glicina, serina, arginina, alanina, prolina e cistina), ácidos graxos insaturados, saturados e colesterol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades proteolíticas e dosagem de proteínas dos extratos estão descritas na Tabela 1. A atividade enzimática com azocaseína apresentou resultados de 1116,94; 170,68 e 106,65 mUmin⁻¹ para os extratos com alcalase (HPP_{com}), 100 (HPP₁₀₀) e 600mg/mL (HPP₆₀₀),

respectivamente, havendo diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). Resultados diferentes foram encontrados para os peixes *Arapaima gigas* (59,83 U/mg) (Lima, 2009) e *Colossoma macropomum* (3653 U/mg) (Bezerra, et al., 2001), ambos elaborados com cecos pilóricos. Essas diferenças podem ocorrer em virtude dos animais apresentarem hábitos alimentares distintos, bem como os ensaios terem sido feitos com diferentes órgãos.

Na Tabela 1 observa-se os resultados obtidos com as proteases e as diferenças significativas entre os ensaios dos três extratos. Evidenciou-se que apesar da tripsina ser uma enzima chave na digestão protéica, as atividades com BApNA, um dos substratos específicos internacionalmente utilizados para a determinação de atividade trípica (Klomkiao, Benjakul, Visessanguan, Kishimura & Simpson, 2007), se mostrou bem inferior se comparada com as atividades utilizando SApna e Succ-phe-p-NAN, os quais são substratos específicos para quimotripsina. Entre todos os substratos utilizados, o que apresentou menor atividade proteolítica em relação a todos os extratos foi o LEUPNAN, específico para leucinoaminopeptidase.

O efeito da hidrólise enzimática dos três HPP está demonstrado pela eletroforese SDS-PAGE (Figura 1). Percebe-se que o perfil das proteínas foi substancialmente alterado em relação ao controle (carcaça sem adição de enzima). Os padrões eletroforéticos indicaram que o HPP_{com} e HPP₆₀₀ hidrolisaram mais que o HPP₁₀₀. As maiores bandas com pesos moleculares entre 198,51 e 19,80 KDa indicaram as variantes do controle (Figura 1). Após 240 minutos de hidrólise, observou-se degradação quase completa do substrato e pesos moleculares de 53,89 KDa (HPP_{com}), entre 198,51 e 53,89 KDa (HPP₁₀₀) e entre 53,89 e 37,41 KDa (HPP₆₀₀) (Figura 1). Os peptídeos formaram bandas visíveis abaixo de 53,89 KDa. A hidrólise dos HPP_{com} e ₆₀₀ ficou mais evidenciada que a do HPP₁₀₀. Isso pode ser atribuído a especificidade das proteases em clivar vários peptídeos.

Li, Youravong & Kittikun (2010), hidrolisou caseína (87,3g/100g) com alcalase 0,6L (Novo Nordisk, Denmark) e extrato de baço de atum (*Tunnus albacores*) purificado na

proporção de 0,4mL/100mL (E/S) para ambos, no qual após 180 minutos de hidrólise obteve-se peso molecular em torno de 19 KDa para ambas enzimas. Um alto grau de hidrólise pode ser obtido com a combinação de endo e exo-proteases (Li et al. 2010). A maior hidrólise da caseína pela alcalase pode ser atribuída a sua habilidade de hidrolisar ligações peptídicas com resíduos de aminoácidos aromáticos adjacentes (Kim, Seo, Khan, Ki, Lee & Lee, 2007). A Alcalase constitui uma grande classe de enzimas microbianas. O principal componente da alcalase, subtilisina A é uma serino-endo-protease com grande especificidade em clivar peptídeos em Gln⁴-His⁵, Ser⁹-His¹⁰, Leu¹⁵-Tyr¹⁶ e Tyr²⁶-Thr²⁷ (Li et al. 2010).

No caso do extrato de intestino (600mg/mL), a alta concentração promoveu maior atividade por parte da tripsina e quimiotripsina. A tripsina cliva as ligações peptídicas no lado carboxila de resíduos de aminoácidos carregados positivamente como arginina e lisina. A quimiotripsina catalisa mais eficientemente a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas na porção carboxila de aminoácidos aromáticos como: fenilalanina, tirosina e triptofano (Klomkiao et al., 2007).

Foi realizado zimograma (Figura 1) e observou-se sete bandas nos poços dos extratos com 600 e 100mg/mL e quatro bandas nos poços com o extrato alcalase, as quais representam enzimas com capacidade proteolítica que estariam agindo na hidrólise da carcaça da tilápia, (entre essas bandas podem estar a tripsina e quimiotripsina como comprovado nos ensaios específicos das atividades das proteases).

O grau de hidrólise (GH) é um parâmetro temporal utilizado para comparar hidrolisados protéicos entre si. A variação do grau de hidrólise depende da relação E/S e do tipo das enzimas. O perfil do GH (tempo 0 a 240 minutos) dos HPP_{com, 100} e 600 é observado na Figura 2, que demonstra que ao final de 240 minutos o GH correspondeu a 44,66; 28, 40 e 61,82%, para os HPP_{com, 100} e 600 respectivamente. Os parâmetros assintóticos PMH TMHM dos HPP_{com, 100} e 600 foram 55.31±3.28; 34.70±3.60 e 81.82±4.92% e 57.34±10.36;

85.29±22.62 e 77.42±12.41, respectivamente. Essa variação de menores e maiores GH nos HPP com autólise enzimática mostra que a relação E/S exerce uma grande influência no GH.

Cândido e Sgarbieri (2003) que hidrolisaram as proteínas de *Oreochromis niloticus* com a enzima flavourzyme em pH 7 a 50° C obtiveram maior GH em maiores concentrações de substrato, obtendo valores de GH na faixa de 2,5 a 45%. Diniz e Martin (1996) estudaram o efeito do pH, temperatura e proporção de enzima-substrato no grau de hidrólise de proteína de músculo de *Squalus acanthias* com a enzima Alcalase encontraram 15,6% de grau de hidrólise com uma concentração de enzima-substrato (2%). Li et al. (2010), produziram hidrolisados protéicos utilizando caseína e soja como substrato e proteases, alcalase e extrato purificado de baço de atum, *Tunnus albacores*, onde após 180 minutos de hidrólise obteve GH de 43,8 e 43,7% e 33,5 e 20,4%, respectivamente. Schmidt et al. (2009) testaram à influência da ação da alcalase no GH no peito e coxa de frango e obtiveram após 90 minutos GH variando de 20,93 a 57,42% no hidrolisado de peito de frango e após 120 minutos de 18,62 a 38,79% no hidrolisado de coxa de frango. Kristinsson e Rasco (2000), obtiveram 14,08% de GH utilizando extrato de ceco pilórico de *Salmo salar* para hidrolisar músculo do próprio peixe ao término de 180 minutos de hidrólise.

Uma relação entre as atividades das enzimas e o grau de hidrólise, foi observada o que evidenciou que quanto maior a atividade da enzima maior a quebra das proteínas em peptídios menores. Isto permite uma melhor digestibilidade e melhor aproveitamento dos aminoácidos durante o consumo do alimento. Neste caso, o valor do GH do HPP₆₀₀ foi maior que os demais, o que evidencia que dentro destas condições a hidrólise por autólise é mais eficiente que a hidrólise enzimática com alcalase.

Em relação aos outros hidrolisados comparados, fatores como a relação E/S, tempo de hidrólise, temperatura, tipo de proteína utilizada e método de avaliação do GH promoveram essas diferenças nos valores dos GH. Em todo caso aumentando a concentração de proteases há aumento do GH, porém se a enzima utilizada for comercial os custos em função da

utilização de maiores quantidades de enzima poderão ser elevados daí a importância da utilização de enzimas que podem ser extraídas de resíduos descartados pela indústria pesqueira.

A composição centesimal e valor calórico dos HPP produzidos e da carcaça de tilápia está demonstrada Tabela 2. Com exceção do HPP₁₀₀ (407,00 g/kg⁻¹ de proteína), os demais conteúdos protéicos HPP_{com} (584,80 g/kg⁻¹) e HPP₆₀₀ (508,20 g/kg⁻¹) foram superiores ao encontrado nos hidrolisados protéicos da cabeça de *Litopenaeus vannamei* (483,06 g/kg⁻¹) por Silva (2004) e de cascas do camarão *Cragon. cragon* (406,00 g/kg⁻¹) por Synowiecki e Alkhateeb (2000). Entretanto, os mesmos conteúdos foram menores que o do hidrolisado protéico de *Prionotus punctatus* (878,4 g/kg⁻¹) (Zavareze, Silva, Salas-Mellado & Prentice-Hernandez, 2009) e das farinhas de peixe menhaden (645,00 g/kg⁻¹) NRC (1993) e *Merluccius Gayi peruanus* (631,29 g/kg⁻¹) (Gómez, López-Aceves, Ponce-Palafox, Gonzalez & Figueroa, 2008), principal fonte protéica em alimentos para organismos aquáticos.

O teor de lipídeos (Tabela 2) em todos os HPP bem como na carcaça foi bastante acima do encontrado na farinha de peixe. Estes resultados também diferiram dos encontrados no hidrolisado protéico *Prionotus punctatus* (40,4 g/kg⁻¹) produzidos por Zavareze et al. (2009), e nos hidrolisados protéicos de *Litopenaeus vannamei* (69,19 g/kg⁻¹) (Silva, 2004) e *Cragon cragon* (99,5 g/kg⁻¹) (Synowiecki et al., 2000). Este alto teor de lipídeos pode estar atribuído à própria carcaça do peixe ou aos extratos de intestino, utilizados no processo de hidrólise que precisariam passar por processos de centrifugação ou semi-purificação enzimática para eliminar interferentes como os lipídeos. Procedimento adequado pois quanto menor o teor de lipídeos, menor a possibilidade de haver oxidação, o que permite uma melhor estabilidade do produto durante o armazenamento.

A Tabela 5 mostra em detalhes a composição de ácidos graxos e o conteúdo de colesterol dos HPP estudados. O conteúdo de ácidos graxos saturados dos HPP_{com}, 100 e 600 foram (88,3; 139,0 e 40,8 g/kg⁻¹), com predominância dos ácidos mirístico (C14:0), palmítico

(C16:0) e esteárico (C18:0). Os ácidos graxos monoinsaturados estão presentes em em 101,7 gkg^{-1} (HPP_{com}), 134,4 gkg^{-1} (HPP₁₀₀) e 29,7 gkg^{-1} (HPP₆₀₀), com predominância dos ácidos oléico (C18:1n9c) e palmitoléico (C16:1). E o conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados dos HPP_{com}, 100 e 600 foram (54,0; 62,0 e 16,3 gkg^{-1}), com a presença predominante do ácido linoleico (C18:2n6).

Os ácidos graxos essenciais exercem grande influência no desenvolvimento de peixes e camarões, o catfish, truta arco-íris e salmão do pacífico, por exemplo, requerem na sua alimentação de 0,5 a 1,0; 1,0 e 1,0 a 2,0% de n3 (NRC, 1993), respectivamente. A tilápia, carpa-comum e truta-arcoíris requerem, de 0,5 a 1,0; 1,0 e 1,0% de n6 (NRC, 1993), respectivamente e o *Macrobrachium rosenbergii* requer 0,99% de n3 e 1,40% de n6 (Reigh e Stickney, 1989). Os peneídeos não têm um requerimento de lipídeos definido, porém são recomendados níveis entre 6 e 10% nas rações comerciais (Shiau, 1998). Entretanto requerem ácidos graxos poliinsaturados, fosfolipídeos e esteróis. Shiau. (1998) demonstraram que quatro ácidos graxos são considerados essenciais para *P. japonicus*: linoleico (18:2n6), linolênico (18:3n3), eicosapentaenóico (20:5n3, EPA) e docosahexaenóico (22:6n3, DHA). Estes dois últimos, ácidos graxos altamente insaturados da família n3 (HUFA), são indispensáveis para manter a capacidade de combater o estresse, sobrevivência, crescimento e maturação sexual. O nível ótimo de EPA e DHA na dieta para juvenis de *P. japonicus* é de 1% (Shiau, 1998).

Quanto ao teor de cinzas, todos os HPP_{com} (26,7 gkg^{-1}), HPP₁₀₀ (52,1 gkg^{-1}) e HPP₆₀₀ (30,4 gkg^{-1}) apresentaram valores menores que as farinhas de peixe menhaden (190,0 gkg^{-1}) e *Merluccius gayi peruanus* (214,3%) assim como dos hidrolisados protéicos de camarão (Silva, 2004) (81,04 gkg^{-1}) e peixe (Zavareze et al., 2009) (81,2 gkg^{-1}). Elevados teores de cinza (140,0 gkg^{-1}) também foram encontrados por Diniz et al. (1996) em estudo realizado com *Squalus acanthias*. Quanto maior o teor de cinzas, maior o resíduo inorgânico e menor o aproveitamento da matéria orgânica. Isto indica a boa qualidade dos produtos obtidos.

A composição dos aminoácidos totais dos HPP produzidos está especificada na Tabela 3. Os HPP demonstraram ser uma boa fonte de aminoácidos essenciais, os mesmos suprem as necessidades nutricionais de camarões carnívoros e onívoros na fase juvenil. Metionina e lisina, importantes aminoácidos para peixes e camarões como suplementação de dietas, encontrados principalmente em farinhas de peixe, foram encontrados respectivamente em níveis de 17,1 e 41,2 gkg^{-1} (HPP_{com}), (14,0 e 28,8 gkg^{-1}) (HPP₁₀₀) e (19,2 e 40,3 gkg^{-1}) (HPP₆₀₀). Estes teores foram parcialmente maiores que os da farinha de menhaden, com metionina (18,0 gkg^{-1}) e lisina (39,8 gkg^{-1}) e maiores que os da farinha de soja com metionina (4,7 gkg^{-1}) e lisina (25,7 gkg^{-1}). Entretanto, Diniz et al. (1996) obtiveram 26,5 gkg^{-1} de metionina e 89,4 gkg^{-1} de lisina em HPP de músculo de *Squalus acanthias* preparado com alcalase.

Os valores obtidos para a composição dos aminoácidos das proteínas estudadas foram divididos pelos valores recomendados pela FAO (1989) para requerimentos nutricionais de camarões carnívoros e onívoros na fase juvenil, e o resultado, denominado escore químico de aminoácido (Tabela 4), permitiu determinar os aminoácidos limitantes em cada fonte de proteína. Uma proteína que apresenta escore químico maior que o valor 1,0 para todos os aminoácidos é considerado de alto valor nutricional e o aminoácido que apresentar escore químico menor que 1,0 é chamado aminoácido limitante.

O valor nutritivo de uma proteína depende, sobretudo, de sua capacidade de fornecer aminoácidos, em quantidades adequadas, para suprir as necessidades do organismo. Os HPP produzidos através de autólise demonstraram suprir as exigências nutricionais de camarões, o que evidencia que estes HPP poderão constituir uma boa fonte de proteínas em ração para organismos aquáticos.

4. Conclusões

Foi possível obter hidrolisados protéicos de peixe com diferentes valores de Grau de Hidrólise. Observou-se que a hidrólise por autólise, com alta concentração de enzima (600 mg de tecido por mL de extrato), foi mais eficiente na hidrólise da carcaça do peixe. Todos os extratos testados comprovaram suas atividades proteolíticas. Os resultados da composição de aminoácidos sugerem que HPP produzido por autólise pode servir como ingrediente na composição de ração para camarão. O alto teor de lipídeos sugere uma semi-purificação do extrato antes de utilizá-lo na autólise enzimática bem como análise de rancidez nos HPP.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES, PETROBRAS, SEAP/PR, CNPq, FINEP e FACEPE por fornecer o apoio financeiro para concluir este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C. B. B., & Carvalho Jr. L. B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.*, 40, 1829–1834.
- Bezerra, R. S., Santos, J. F., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Vieira, V. L. A., & Carvalho Jr., L. B. (2001). Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *J Food Biochem*, 25 (3), 199-210.

Bezerra, R. S. Proteases digestivas no Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tese Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

Cândido, L. M. B., & Sgarbieri, V. C.; J. (2003). Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. *Sci Food Agric*, 83, 937–944.

Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 419–426.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>). 2008.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>). 1989.

García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., & Haard, N.F.(1993). Substrate-gel eletrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 65-69.

Gomez, M. G. U., López-Aceves, L. A., Ponce-Palafox, J. T., González, H. R., & Figueroa, J. L. A. (2008). Growth of Fresh-Water Prawn *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871)

Juveniles Fed Isoproteic Diets Substituting Fish Meal by Soya Bean Meal. *Brazilian archives of biology and technology*, 51, 57-65.

Halver, J. E. (1995) Use of INFIC data base for amino acid requeriments studies. *J Appl Ichthyo*, 11,129–140.

Ibama. (2008). Estatística da pesca 2006. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília-DF, 174p.

Kim, S. B., Seo, I. S., Khan, M. A., Ki, K. S., Lee,W. S., & Lee, H. J. (2007). Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. *Journal of Dairy Science*, 90, 4033–4042.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2007). Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelanis*). *Food Chemistry*, 100, 1580-1589.

Kristinsson, H.G., B. Rasco. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139.

Instituto adolfo lutz. (2005). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV edição, Brasília.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Li, Z. Y., Youravong, W., & Kittikun, A. H. (2010). Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 166–172.

Lima, J.A. caracterização de proteases digestórias no peixe carnívoro pirarucu, *Arapaima gigas*, (SHINZ 1822). Monografia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2009.

Martone, C.B., Borla, O.P., & Sánchez. J.J. (2005). Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Bioresource Technology*, 96, 383-387.

Nutrient Requirements of Fish Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture National Research Council NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C. 1993.

Reigh, R.C., & Stickney, R.R. (1989). Effects of purified fatty acids on the fatty acid composition of freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 77, 157-174.

Schmidt, C. G., Sala-Mellado, M. (2009) Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Quim. Nova*, 32, (5), 1144-1150.

Shiau, Shi-Yen. (1998). Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 77–93

Silva, C.P. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado protéico de subprodutos de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2004.

Synowiecki, J., & Al-khateeb, N.A.A.Q. (2000). The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon Crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68, 147-152.

Warburg, O., & Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolasc. *Biochemical Zeitschrift*, 310, 384-421.

Yaobo, L. (2002). Silver staining for SDS-PAGE. (in Chinese). In W. Jiazheng, & F. Ming (Eds.), *Protein technology handbook* (pp. 92-97.). Beijing: Science Press, (key reference for experimental method).

Zavareze, E. R., Silva, C.M., Mellado, M.S., & Prentice-Hernández, C. (2009). Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Quim. Nova*, 32, (7), 1739-1743

Tabela 1 – Atividades proteolíticas das enzimas que atuaram nos hidrolisados protéicos de peixe (HPP).

Enzimas	Proteína (mg/mL)	Atividade total (mUmin ⁻¹)	Atividades específicas (mU/min ⁻¹)*			
			AZOCASEÍNA 1%	BApNA	SAPNA	Suc-phe-p-Nan
Alcalase	7,107	1116,94±1,46 ^a	19,59±1,57 ^a	321,68±0,07 ^a	23936,92±2,19 ^{a,c}	54,63±0,89 ^a
100 mg/ml	13,378	170,68±1,25 ^b	133,62±1,67 ^b	95,01±0,95 ^b	416,57±1,69 ^b	124,5±1,10 ^b
600 mg/ml	52,3	106,65±0,49 ^c	269,69±1,71 ^c	384,91±0,69 ^c	1269,09±1,61 ^{b,c}	160,99±1,12 ^b

*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 2 – Comparação da composição centesimal e valor calórico dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP) e carcaça de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com farinha de peixe.

COMPONENTES	UNIDADE	HPP _{com} ^a	HPP ₁₀₀ ^a	HPP ₆₀₀ ^a	Carcaça ^a	Farinha de menhaden ^b
Matéria seca	g.kg ⁻¹	186,80	222,40	171,20	360,20	920,00
Proteína	g.kg ⁻¹	584,80	407,00	508,20	423,60	645,00
Lipídios totais	g.kg ⁻¹	374,70	492,30	445,10	428,40	96,00
Cinzas	g.kg ⁻¹	26,70	52,10	30,40	99,40	190,00
Carboidratos	g.kg ⁻¹	13,90	48,5	16,30	48,60	14,00
Fibra bruta	g.kg ⁻¹	18,70	33,2	17,50	12,80	7,00
Valor calórico	Kcal/100g	106,00	136,11	103,38	205,07	406,00

^aPresente estudo, ^bNRC (1993).

Tabela 3 – Comparação dos aminoácidos totais dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP) e outros ingredientes usados em alimentos para organismos aquáticos.

Aminoácidos Essencial (gkg⁻¹)	HPP_{com}^a	HPP₁₀₀^a	HPP₆₀₀^a	Farinha de peixe^b	Farinha de soja^b	Requerimentos de AA para juvenis de camarões carnívoros^c	Requerimentos de AA para juvenis de camarões onívoros^c
Histidina	11,8	7,64	11,0	14,0	12,5	8,5	6,2
Isoleucina	20,9	13,9	20,4	21,5	17,5	13,1	9,5
Leucina	35,7	27,8	39,7	37,7	29,1	26,9	19,6
Lisina	41,2	28,8	40,3	39,8	25,7	28,3	20,6
Metionina	17,1	14,0	19,2	18,0	4,7	10,4	7,6
Fenilalanina	22,5	20,0	21,6	18,1	19,1	14,8	10,8
Treonina	24,6	16,2	22,1	19,9	15,1	18,5	13,4
Triptofano	22,5	3,6	4,1	3,9	8,0	5,2	3,8
Valina	26,7	16,2	23,3	25,9	19,0	16,4	11,9
Serina	25,7	17,1	24,5	-	-	-	-
Arginina	48,7	29,6	42,0	36,8	30,5	29,8	21,7
Não Essencial (gkg⁻¹)							
Tirosina	15,5	10,3	15,1	-	-	15,0	10,9
Ác. Aspártico	55,6	36,4	47,8	-	-	-	-
Ác. Glutâmico	89,4	55,3	77,6	-	-	-	-
Glicina	80,2	45,4	63,6	-	-	-	-
Alanina	49,8	29,7	40,8	-	-	-	-
Prolina	45,5	27,4	39,1	-	-	-	-
Cistina	9,7	5,8	13,4	-	-	5,2	3,8
Taurina	5,9	4,5	8,2	-	-	-	-

^a Presente estudo, ^b Halver (1995), ^c FAO (1989).

Tabela 4 - Escore químico de aminoácidos das proteínas estudadas e da farinha de peixe (g/kg^{-1}).

Aminoácidos	Escore de aminoácido (g/kg^{-1} proteína amostra) / (g/kg^{-1} proteína para juvenis de camarões carnívoros)				Escore de aminoácido (g/kg^{-1} proteína amostra) / (g/kg^{-1} proteína para juvenis de camarões onívoros)			
	HPP _{com}	HPP ₁₀₀	HPP ₆₀₀	Farinha de peixe	HPP _{com}	HPP ₁₀₀	HPP ₆₀₀	Farinha de peixe
Histidina	1,4	0,9	1,3	1,6	1,9	1,2	1,8	2,3
Isoleucina	1,6	1,1	1,6	1,6	2,2	1,5	2,1	2,3
Leucina	1,3	1,0	1,5	1,4	1,8	1,4	2,0	1,9
Lisina	1,5	1,0	1,4	1,4	2,0	1,4	2,0	1,9
Metionina	1,6	1,3	1,8	1,7	2,3	1,8	2,5	2,4
Fenilalanina	1,5	1,4	2,0	1,2	2,1	1,9	2,0	1,7
Treonina	1,3	0,9	1,2	1,1	1,8	1,2	1,6	1,5
Triptofano	4,3	0,7	0,8	0,8	5,9	0,9	1,1	1,0
Valina	1,6	1,0	1,4	1,6	2,2	1,4	2,0	2,2
Arginina	1,6	1,0	1,4	1,2	2,2	1,4	1,9	1,7
Tirosina	1,0	0,7	1,0	-	1,4	0,9	1,4	-
Cistina	1,9	1,1	3,5	-	2,6	1,5	3,5	-

Tabela 5 – Comparação da composição dos ácidos graxos dos hidrolisados protéicos de peixe (HPP) com hidrolisado protéico de camarão *Litopenaeus vannamei*.

ÁCIDOS GRAXOS (gkg ⁻¹)	HPP _{com}	HPP ₁₀₀	HPP ₆₀₀
(C12)	0,5	0,4	-
(C14:0)	10,1	15,7	4,1
(C15:0)	1,0	2,2	0,0
(C16:0)	61,5	91,7	28,0
(C17:0)	1,0	2,6	0,6
(C18:0)	12,8	20,6	7,0
(C20:0)	0,5	0,9	0,6
(C21:0)	0,0	0,0	-
(C22:0)	0,5	3,1	0,0
(C24:0)	0,0	0,0	-
Gorduras Saturadas	88,3	139,0	40,8
(C14:1)	0,5	0,9	0,0
(C16:1)	17,6	22,4	4,6
(C17:1)	-	1,3	-
(C18:1n9c)	79,2	100,7	23,3
(C20:1)	3,7	4,9	1,75
(C22:1n9)	0,00	4,0	0,0
(C24:1)	0,5	0,0	-
Gorduras Monoinsaturadas	101,7	134,4	29,7
(C18:2n6c)	37,4	48,1	11,6
(C18:3n6)	2,1	3,5	0,6
(C18:3n3)	2,7	4,0	0,6
(C20:2)	2,1	0,9	0,6
(C20-3n3)	2,1	-	0,0
(C20:3n6)	0,5	0,9	0,0
(C20:4n6)	2,1	-	0,6
(C20:5n3)	0,5	0,4	-
(C22:6n3)	3,2	3,6	0,6
Gorduras Pol-Insaturadas	54,0	62,0	16,3
(C18:1n9t)	1,0	1,8	0,0
Gorduras Trans	1,0	1,8	0,0
Ômega 3	3,7	4,5	1,2
Ômega 6	44,9	52,6	14,0
Colesterol (mg/Kg)	52,85	535,93	671,71

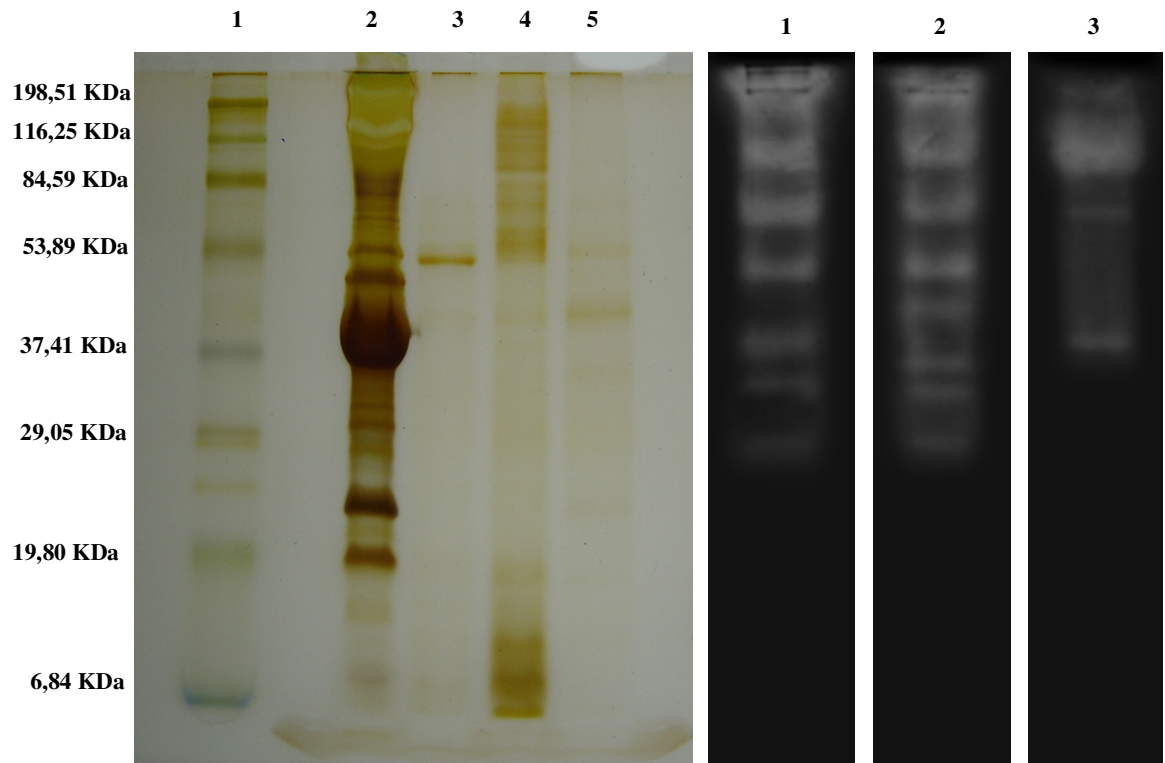


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE dos hidrolisados protéicos de peixe. No poço 1 (padrão de peso molecular), no poço 2 (controle), no poço 3 (HPP_{com}), no poço 4 (HPP₁₀₀), no poço 5 (HPP₆₀₀) e zimograma em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE. No poço 1 (extratos de 600 mg/mL), no poço 2 (extrato de 100 mg/mL) e no poço 3 (extrato com alcalase a 0,5%).

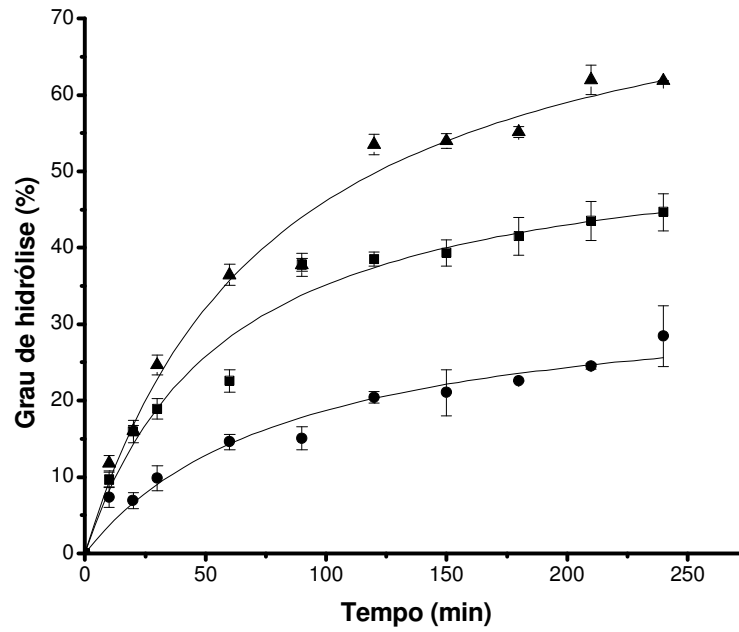


Figura 2 – Grau de hidrólise dos hidrolisados proteicos de peixe (■ HPP_{com} $R^2 = 0.97708$), (HPP₁₀₀, $R^2 = 0.95775$) (▲ HPP₆₀₀ $R^2 = 0.98462$).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível obter hidrolisados protéicos de peixe com diferentes valores de Grau de Hidrólise. Observou-se que a hidrólise por autólise, com alta concentração de enzima (600 mg de tecido por mL de extrato), foi mais eficiente na hidrólise da carcaça do peixe. Todos os extratos testados comprovaram suas atividades proteolíticas. Os resultados da composição de aminoácidos sugerem que HPP produzido por autólise pode servir como ingrediente na composição de ração para camarão. O alto teor de lipídeos sugere uma semi-purificação do extrato antes de utilizá-lo na autólise enzimática bem como análise de rancidez nos HPP.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G.H.. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 69-74, 2002

ALAM, M.S.; TESHIMA, S.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M., HERNANDEZ, L.H.H.; UYAN, O.; MICHAEL, F.R. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 248, p. 13-19, 2005.

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

BENJAKUL, B.; MORRISSEY, M.T.. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 3424-3430, 1997.

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

BEZERRA, R.S.; SOUZA, D.B.; AMARAL, I.P.G.; CASTRO, P.F.; ESPÓSITO, T.S.; SANTOS, S.D.; CARVALHO JR, L.B. Propriedades e aplicações biotecnológicas das proteases de vísceras de peixes. **Aquaciência**, v. 18, p. 262-275, 2006.

BEZERRA R. S.; LINS E. J. F.; ALENCAR R. B.; PAIVA P. M. G.; CHAVES M. E. C.; COELHO L. C. B. B.; CARVALHO JR. L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) **Process Biochem**, v. 40, p. 1829–1834, 2005

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

BEZERRA, R. S. Proteases digestivas no Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tese Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

CAHU, C.L.; RØNNESTAD, I.; GRANGIER, V.; ZAMBONINO INFANTE, J.L. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) in relation to intact and hydrolysed dietary protein; involvement of cholecystokinin. *Aquaculture*, v. 238, p. 295–308, 2004.

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C.; J. Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and hydrophilic properties. *Sci Food Agric*, v. 83, p. 937–944, 2003.

CARVALHO, A. P.; ESCAFFRZ, A. M.; TELES, A. O.; BERGOT, P. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International*, v.5, p. 361-367, 1997.

CAVALHEIRO, J.M.O.; SOUZA, E.O.; BORA, P.S. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) feed. *Bioresour. Technol.* v. 98 (3), p. 602-606, 2007.

CENTENARO, G. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. E.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados protéicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Quim. Nova**, v. 32 (7), p. 1792-1798, 2009.

DAVIS, D.A.; ARNOLD, C.R. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 235, p. 291-298, 2000.

DINIZ, F. M.; E A.; MARTIN M.. Hidrolisado Protéico de Pescado. P. 360-365 in M. Ogawa; e E.L. Maia, editores. **Manual de Pesca: Ciência e tecnologia do pescado**. Editora Varela, São Paulo, 1999.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A. M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 419–426, 1996.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>), 2008.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>), 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma (obtained by internet, <http://www.fao.org>). 1989.

FARIA, A.C.E.A.; HAYASHI, C.; GALDIOLI, E.M.; SOARES, C.M. Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa. **Acta Scientiarum**, v. 23, (4), p. 903-908, 2001.

FONKWE, L. G.; SINGH, R. K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 605, 1996.

FONSECA, F.A.L. Substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal com adição de protease exógena na digestibilidade de ração para juvenis de pirarucu. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2004.

FRANCIS, F.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v.199, p. 197–227, 2001.

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

FURUYA, W.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V.R.B.; BOTARO, D.; SILVA, L.C.; NEVES, P.R. Exigências de metionina + cistina total e digestível para alevinos revertidos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), baseadas no conceito de proteína ideal. **Acta Scientiarum**, v. 23, (4), p. 885-889, 2001a.

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; BARROS, M.M.; MIRANDA, E.C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, (4), p. 1143-1149, 2001b.

GARCÍA-CARREÑO, F.L.; DIMES, L.E.; HAARD, N.F. Substrate-gel eletrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. **Analytical Biochemistry**, v.. 214, p. 65-69, 1993.

GOLDHOR, S.H.; REGENSTEIN, J.M. U.S. fisheries products: a selective update and review. **Foodstuffs**, v. 60 (20), p.14-16, 1988.

GOMEZ, M. G. U.; LÓPEZ-ACEVES, L. A.; PONCE-PALAFOX, J. T.; GONZÁLEZ, H. R.; FIGUEROA, J. L. A. Growth of Fresh-Water Prawn *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) Juveniles Fed Isoproteic Diets Substituting Fish Meal by Soya Bean Meal. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 51, p. 57-65, 2008.

HALVER, J. E. Use of INFIC data base for amino acid requeriments studies. **J Appl Ichthyo**, v. 11, p.129–140, 1995.

HAYASHI, R.; KAMEDA, I. Decreased proteolysis of alkali-treated protein: consequences of racemization in food processing. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1430 -1431, 1980.

HERNÁNDEZ, M.D.; MARTÍNEZ, F.J.; JOVER, M.; GARCÍA, B. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. **Aquaculture**, v. 263, p. 159-167, 2006.

HOLANDA, H.D. Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

IBAMA. Estatística da pesca 2006. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília-DF, 174p, 2008.

KIM, S. B.; SEO, I. S.; KHAN; M. A.; KI, K. S.; LEE,W. S.; LEE, H. J. Enzymatic hydrolysis of heated whey: iron-binding ability of peptides and antigenic protein fractions. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4033–4042, 2007

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H.; SIMPSON, B. K. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelanis*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 1580-1589, 2007.

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

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

KRISTINSSON, H.G.; RASCO B. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 131-139, 2000b.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from Atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 177-187, 2000c.

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

LI, Z. Y.; YOURAVONG, W.; KITTIKUN, A. H. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 166–172, 2010.

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

LIMA, J.A. caracterização de proteases digestórias no peixe carnívoro pirarucu, *Arapaima gigas*, (SHINZ 1822). Monografia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV edição, Brasília, 2005.

MAHMOUD, M. I. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. **Food Technology**, v. 40, (11), p. 89-113, 1994.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 383-387, 2005.

MENTE, E.; COUTTEAU, P.; HOULIHAN, D.; DAVIDSON, I.; SORGELOOS, P. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 3107–3122, 2002.

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

NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION BOARD ON AGRICULTURE NATIONAL RESEARCH COUNCIL NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C. 1993.

OETTERER, M. Produtos Obtidos por Interferência na Fração Protéica do Pescado. Piracicaba: ESALQ, 2001.

OLVERA-NOVOA, M.A.; PEREIRA-PACHECO, F.; OLIVERA-CASTILLO, L.; PÉREZ-FLORES, V.; NAVARRO, L.; SÁMANO, J.C. Cowpea (*Vigna unguiculata*) protein concentrate as replacement for fish meal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquaculture**, v. 158, p. 107-116, 1997.

RAO, M. B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

REIGH, R.C.; STICKNEY, R.R. (1989). Effects of purified fatty acids on the fatty acid composition of freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 77, p. 157-174.

SCHMIDT, C.G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Quim. Nova**, v. 32, (5), p. 1144–1150, 2009.

SHIAU, SHI-YEN. Nutrient requirements of penaeid shrimps. **Aquaculture**, v. 164, p. 77–93, 1998.

SIDWELL, V.D; STILLINGS, B.R.; KNOBL,G.M. The fish protein concentrate story. **Food Technology**, v. 24, p. 876-882, 1970.

SILVA, C.P. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado protéico de subprodutos de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2004.

SIMPSON, B.K.; HAARD, N.F. Trypsin from Greenland cod *Gadus ogac*, isolation and comparative properties. **Comp. Biochemistry and Physiology**, v. 79 (4), p 613, 1984.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N.A.A.Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Cragon Cragon* processing discards. **Food Chemistry**, v. 68, p.147-152, 2000.

VINOT, C. et al. Extraction and purification of peptides from fish protein hydrolysates. In: MYIACHI, S. et al. Currents Topics in Marine Biotechnology. Tokio: Fuji Technology Press, 1989.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolasc. **Biochemical Zeitschrift**, v.310, p. 384–421, 1941.

WERGEDAHL, H.; LIASET, B.; GUDBRANDSEN, O. A.; LIED, E.; ESPE, M.; MUNA, MØRK, Z., S.; BERGE, R. K. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-coa:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. **Journal of Nutrition**, v 134, p. 1320-1327, 2004.

WYATT, B.; MCGOURT, G. Use of marine by-products on agricultural crops. In: KELLER, S. Making Profits out of Seafood's Waste. Fairbanks: Alaska Sea Grant Program, Report n.º 90-07, p. 187-195, 1990.

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

7. ANEXO

Guide for Authors

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky
Federal Research Centre of Agriculture
Institute of Animal Nutrition
Bundesallee 50
D-38116 Braunschweig
Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturers guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites

Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has

preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit. Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in *Vol. 134/3-4*, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anifee/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

Article Structure

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or ≤ 1.0 . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is *only* used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent. Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O . The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If $0.10 > P > 0.05$, then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2. Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around * and /. In probability expressions ($P < 0.05$). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

Web

references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same

year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: ☞ <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: ☞ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): ☞ <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞ <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

Additional Information

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):
doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download

Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.