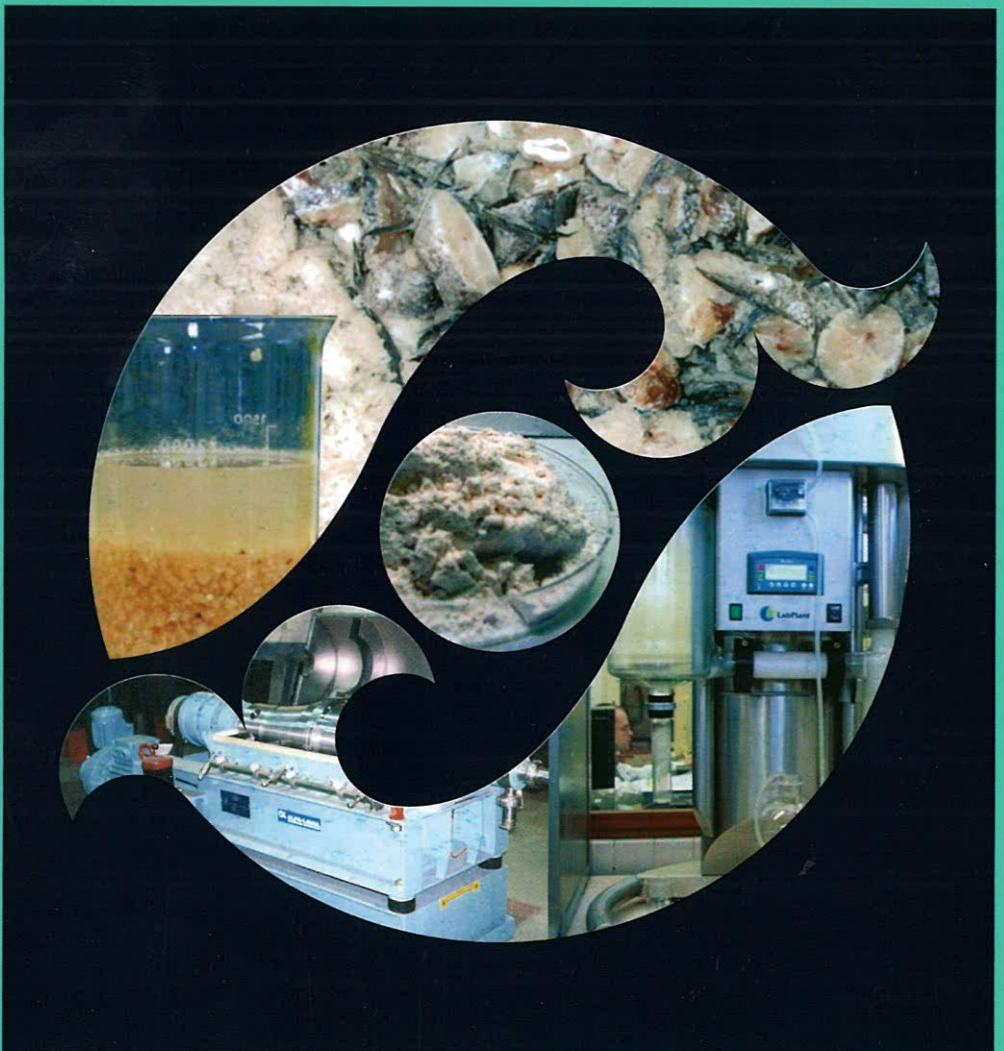


**HIDROLISADOS PROTEICOS
DE PESCADO**
PREPARAÇÃO, PROPRIEDADES E UTILIZAÇÕES

IRINEU BATISTA
CARLA PIRES
MARIA LEONOR NUNES





As **PUBLICAÇÕES AVULSAS DO IPIMAR** destinam-se à divulgação de trabalhos originais e de síntese que, pela sua natureza, se não enquadram nas outras séries do IPIMAR e ainda à reedição e tradução de obras de reconhecido interesse para as ciências aquáticas e as pescas.

Esta colecção substitui as anteriores “Publicações avulsas” do INIP.

Edição

IPIMAR
Avenida de Brasília
1449-006 LISBOA
Portugal

Corpo Editorial

Francisco Ruano - Coordenador
Aida Campos
Fátima Cardador
Irineu Batista
Manuela Falcão
Maria José Brogueira
Maria Manuel Martins
Rogélia Martins

As instruções para os autores estão disponíveis no “site” do IPIMAR
www.ipimar.pt
ou podem ser solicitadas aos membros do Corpo Editorial desta publicação.

Permuta e Vendas

IPIMAR/ Divisão de Documentação e Apoio ao Utente

Todos os direitos reservados.
Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida sem autorização
escrita do editor

**HIDROLISADOS PROTEICOS
DE PESCADO**

Preparação, propriedades e utilizações

Irineu Batista

Carla Pires

Maria Leonor Nunes

Título: Hidrolisados Proteicos de Pescado - Preparação, propriedades e utilizações

Autores: Irineu Batista, Carla Pires, Maria Leonor Nunes

Editor: IPIMAR

Capa: Luís Catalan

Desenho gráfico: Luís Catalan

Composição e Impressão: Palmigráfica

Depósito Legal: 241454/06

ISSN: 0872 - 914X

Tiragem: 1000 exemplares

Departamento de Inovação Tecnológica e Valorização dos Produtos da Pesca, INIAP/IPIMAR. E-mails: irineu@ipimar.pt; carlapires@ipimar.pt; mlnunes@ipimar.pt

Referência Bibliográfica:

BATISTA, I.; PIRES, C.; NUNES, M. L., 2006 - Hidrolisados Proteicos de Pescado - Preparação, propriedades e utilizações. **Publicações Avulsas do IPIMAR**, 14, 32p.

RESUMO

Este trabalho inscreve-se no âmbito das actividades de disseminação previstas no projecto VALBIOMAR (Valorização Biotecnológica dos Recursos Marinhos) e constitui uma forma de materializar as apresentações realizadas em seminários e junto das empresas do sector. O seu objectivo é apresentar, de maneira simples, o modo de preparação, as propriedades e as aplicações dos hidrolisados proteicos de pescado obtidos por via enzimática. Os hidrolisados proteicos representam uma alternativa para o aproveitamento de subprodutos do pescado e possuem um conjunto de propriedades nutricionais e biológicas que lhes conferem um valor acrescentado em relação a outros tipos de produtos obtidos a partir desta matéria-prima. O valor nutricional dos hidrolisados torna-os muito indicados para a alimentação animal e as actividades biológicas que exibem, abrem perspectivas para diversas aplicações farmacológicas.

Palavras chave: Hidrolisados proteicos de pescado, propriedades, aplicações

ABSTRACT

This work was done in the frame of the dissemination activities foreseen in the VALBIOMAR (Valorisation Biotechnologique des Ressources Marines) project. Most of this information was previously presented in seminars and in several fish processing units. The objective of this publication is to present the method of production, properties, and utilisations of enzymatic fish protein hydrolysates (FPH) in a simple way. These products represent an alternative for the upgrading of fish by-products, which exhibit a number of nutritional and biological properties. They represent an added value when compared to other types of seafood products obtained from this raw material. The nutritional value of FPH makes them quite useful for animal feeding. The biological activities of FPH show they constitute a source of promising health beneficial molecules for pharmaceutical applications.

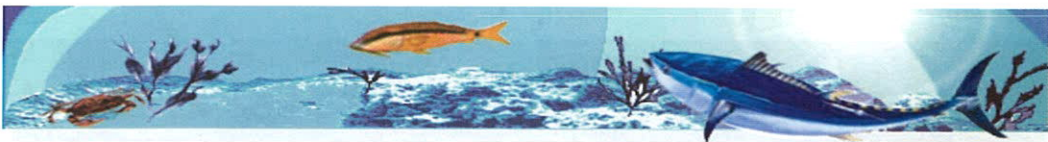
Keywords: Fish protein hydrolysates, properties, applications

Quais os objectivos do projecto VALBIOMAR?



O projecto VALBIOMAR, Valorização Biotecnológica dos Produtos Marinhos, visa:











- Articular as actividades de laboratórios europeus especialmente vocacionados para desenvolver investigação e desenvolvimento e para promover ligações entre a investigação e a exploração dos recursos biológicos marinhos; desenvolver e adequar diferentes processos biotecnológicos para o melhor aproveitamento de recursos da pesca e subprodutos; usar técnicas inovadoras e credíveis na área da utilização biotecnológica dos produtos marinhos; capacitar e apoiar Pequenas e Médias Empresas (PME) do sector no desenvolvimento de actividades para valorizar os recursos da pesca.
- Criar uma Plataforma Atlântica inter-regional, englobando a França, Espanha e Reino Unido, para promover a comunicação e transferência de tecnologias, junto das PME do sector.
- Disseminar a informação disponível junto das PME através da realização de acções de formação e demonstração, seminários e brochuras especializadas.






Quais são os participantes?

Os participantes são de dois tipos:

- Laboratórios de investigação tecnológica cuja actividade se desenvolve nas áreas relacionadas com processos de purificação de biomoléculas, biotransformação de espécies subaproveitadas e subprodutos das unidades de processamento do pescado e teste de actividades biológicas:

-  Réseau des Universités de l'Ouest Atlantique, França
-  Université de La Rochelle, França
-  Muséum National d'Histoire Naturelle, França
-  Université de Nantes, França
-  Université de Bretagne Sud, França
-  Université de Bretagne Occidentale, França
-  Instituto de Investigação Agrária e das Pescas/IPIMAR, Portugal
-  Universidad de La Laguna (Canárias), Espanha
-  Technopole Quimper-Cornouaille, França
-  Institut Français de Recherches pour l'Exploitation de la Mer, França

- Organismos próximos das indústrias regionais que dinamizam os contactos com os industriais, tendo em vista a transferência de tecnologias dos laboratórios para as PME:

-  CETMAR, Centro Tecnológico del Mar – Fundación, Espanha
-  ALICONTROL, Tecnologia e Controlo de Alimentos, Lda, Portugal
-  Integrin Advanced Biosystems Ltd, Reino Unido



Qual a intervenção do IPIMAR?



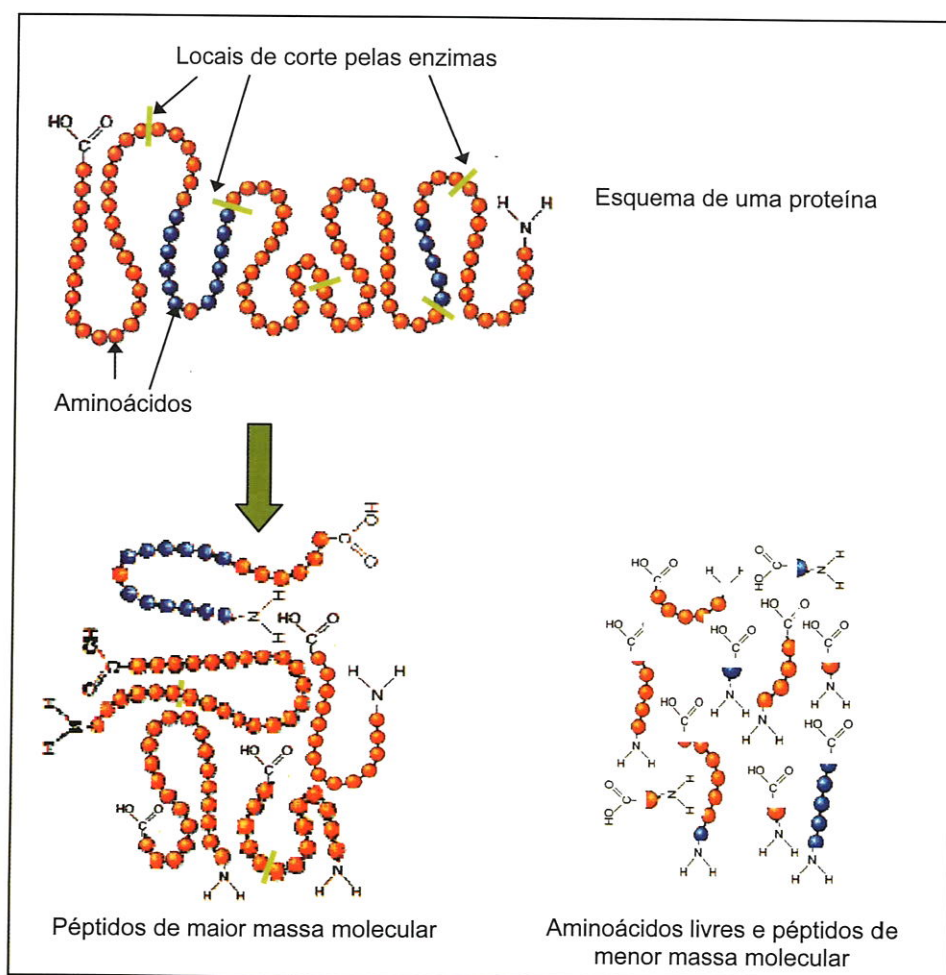
Neste projecto, a actividade a desenvolver pelo IPIMAR centra-se, fundamentalmente, na divulgação, junto do sector produtivo, de processos biotecnológicos já desenvolvidos e destinados a valorizar espécies de menor valor comercial e subprodutos resultantes do processamento do pescado. Este material representa, frequentemente, um problema adicional em toda a fileira da pesca, assumindo particular relevância nas unidades de processamento onde são laboradas grandes quantidades de pescado. Para a valorização desta matéria-prima têm-se seguido diferentes abordagens, de acordo com o desenvolvimento tecnológico do sector produtivo e da especificidade de cada situação. O IPIMAR tem participado no desenvolvimento de diversos projectos nacionais e internacionais sobre o aproveitamento desta matéria-prima tão diversificada. Neste sentido, seleccionou a produção de hidrolisados proteicos de pescado como uma tecnologia adequada para a valorização destes subprodutos a qual é já largamente aplicada em diversos países.



O que são os hidrolisados proteicos?

Os hidrolisados proteicos de peixe são produtos obtidos de peixe inteiro ou subprodutos e resultam da rotura das ligações peptídicas, com a adição de uma molécula de água, por via química ou enzimática. As ligações peptídicas unem os aminoácidos que são as unidades constituintes das proteínas. Ou seja, as proteínas do peixe são fragmentadas, em maior ou menor extensão, em aminoácidos e péptidos de diferentes tamanhos.

Os péptidos são fragmentos das proteínas que apresentam dois ou mais aminoácidos na sua constituição.



Representação esquemática da hidrólise das proteínas.

Qual a matéria prima a utilizar?

As indústrias de transformação do pescado geram grandes quantidades de restos, que representam 30 a 50 % da matéria-prima processada. Registam-se igualmente rejeições e retiradas em lota que, em conjunto com os restos resultantes do processamento, constituem uma importante matéria prima a valorizar.



Na tabela junto apresenta-se a composição química média de restos de pescado provenientes de espécies magras e gordas. Estes valores são apenas indicativos, uma vez que dependem muito da espécie usada e do tipo de processamento.

Composição química aproximada de restos de pescado provenientes de espécies magras e gordas.

	Peixe magro	Peixe gordo
Humidade (%)	82,9	64,0
Proteína (%)	15,4	16,3
Gordura (%)	0,2	13,1
Cinza (%)	1,8	6,3

Como se preparam os hidrolisados proteicos?

Os hidrolisados proteicos são frequentemente preparados por métodos químicos e enzimáticos. Os processos químicos (ácidos ou básicos), embora sejam os mais utilizados industrialmente, podem dar origem à formação de compostos tóxicos, como a lisinoalanina, ou provocar alterações estruturais nos aminoácidos. Por isso, os métodos enzimáticos têm merecido mais interesse porque:

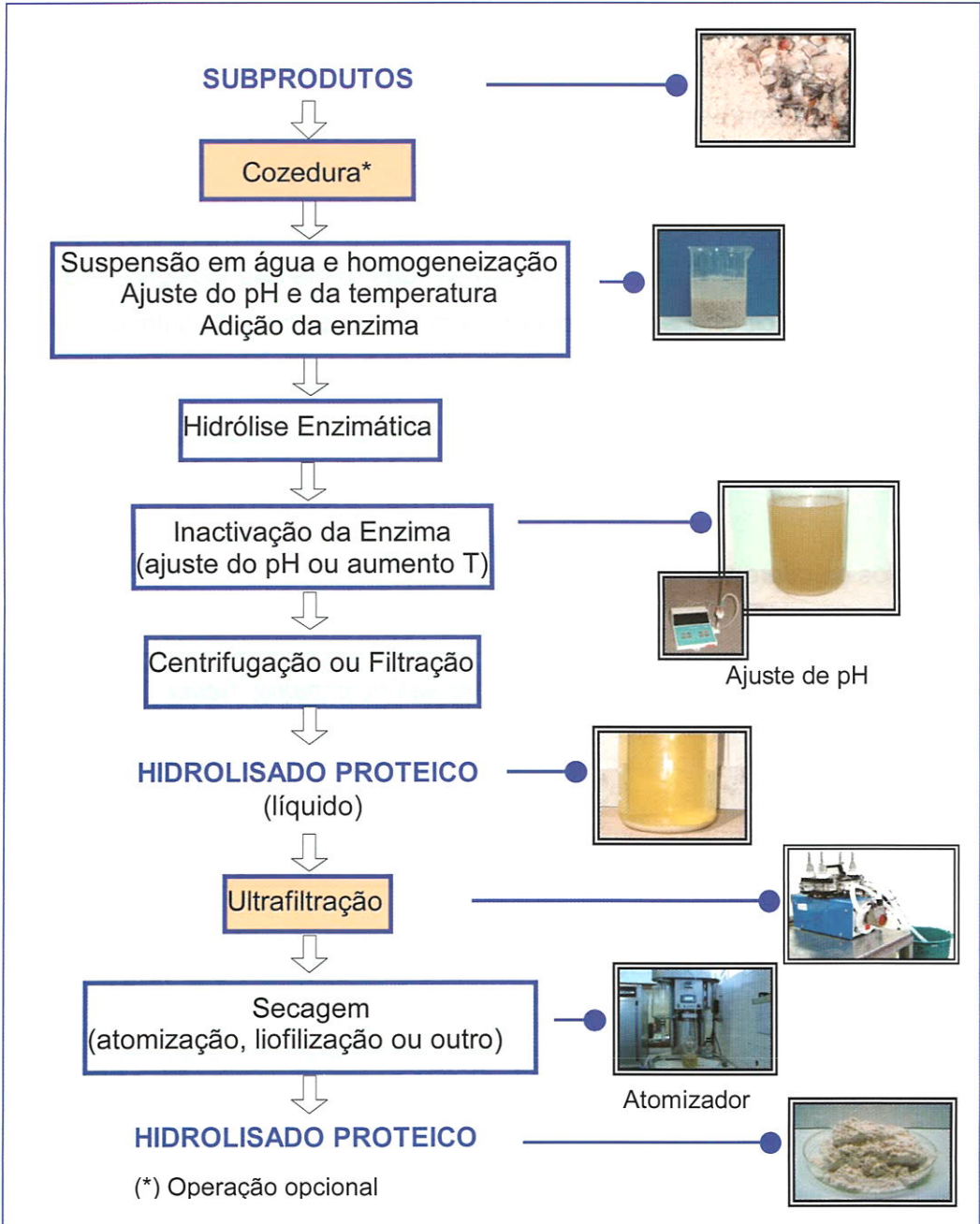
- São menos drásticos;
- Permitem a obtenção de produtos com maior valor nutricional e melhores propriedades funcionais e biológicas;
- Não provocam alterações negativas nos aminoácidos nem levam à formação de substância tóxicas.

Na figura seguinte apresenta-se a sequência de operações seguidas na preparação de hidrolisados enzimáticos de proteínas a partir de restos de pescado.

As operações de cozedura dos restos e de ultrafiltração são opcionais e a sua realização depende das propriedades pretendidas para o produto final.

No caso de subprodutos com um elevado teor em gordura, como os provenientes da indústria de conservas de sardinha, é conveniente proceder à sua remoção prévia. Esta remoção é facilitada se se proceder a um tratamento enzimático preliminar do material em condições suaves.

Como se preparam os hidrolisados proteicos?



Esquema geral de preparação de hidrolisados proteicos.

Que enzimas são utilizadas?

Os hidrolisados enzimáticos podem ser preparados com:

- As próprias enzimas existentes nas vísceras ou no músculo do peixe, denominando-se este processo por autólise;
- Enzimas adicionadas ao pescado.

A adição de enzimas torna o processo mais rápido, controlado e reprodutível. Estas enzimas que catalisam a hidrólise das proteínas designam-se por proteases e são classificadas de acordo com a sua composição química.

As proteases comerciais usadas na produção de hidrolisados proteicos podem ser extraídas de diferentes fontes, mas as mais indicadas para preparar hidrolisados proteicos de pescado são as de origem vegetal ou microbiana.

Exemplos de diferentes tipos de proteases:

- Proteases de origem vegetal: *bromelina, papaína, ficina*
- Proteases de origem animal: *pepsina, tripsina, quimotripsina*
- Proteases de origem microbiana: *subtilisina, bacilolisina*

Algumas designações comerciais das enzimas referidas:

- Proteases de origem vegetal: *bromelase, velardon, debricin*
- Proteases de origem animal: *P I, tryptase, avazyme*
- Proteases de origem microbiana: *alcalase®, neutrase®*

Como seleccionar a enzima a utilizar?

Todas as proteases usadas na preparação de hidrolisados proteicos devem ser de grau alimentar e as de origem microbiana devem ser produzidas por organismos não patogénicos. Normalmente, a escolha da protease a utilizar é determinada por uma combinação da eficiência e de factores económicos.

Assim, em geral, os critérios a seguir na selecção podem resumir-se do seguinte modo:

- Características do produto pretendido
- Eficiência da protease
- Disponibilidade da protease no mercado
- Preço

A escolha do melhor processo de utilização da(s) protease(s) depende da sua eficiência e das características pretendidas para o produto a obter, podendo ser usadas:

- ◆ Isoladamente
- ◆ Em conjunto
- ◆ Em sequência

Frequentemente, as enzimas puras apresentam uma capacidade hidrolítica limitada, sendo por isso recomendável recorrer a misturas de enzimas. Todavia, a solução a adoptar depende de cada situação.

Como se realiza a hidrólise das proteínas?

Os restos de peixe moídos (crus ou cozidos) são misturados com água numa proporção que pode ser de 1 parte de peixe para 2 partes de água. Adiciona-se depois a enzima numa quantidade que depende da actividade e da percentagem de proteína presente na mistura. São usuais percentagens de 0,1 a 2 g de enzima por 100 g de proteína.

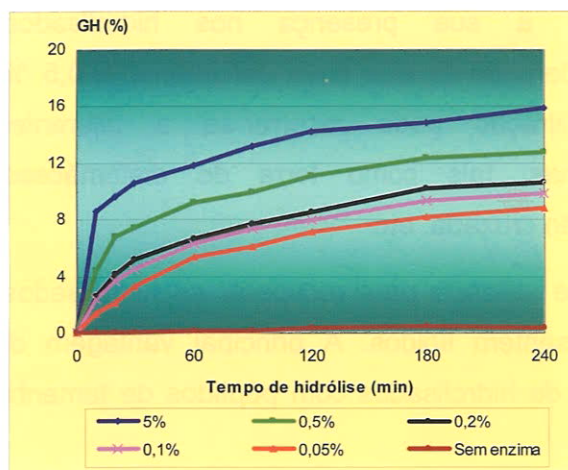
A temperatura a que a hidrólise vai realizar-se depende da enzima usada, situando-se as temperaturas de trabalho mais frequentes na gama de 32 a 49 °C. O tempo de hidrólise pode ser relativamente curto, se se pretender um produto pouco hidrolisado, ou mais dilatado se o objectivo for obter produtos muito hidrolisados. Outro aspecto importante diz respeito à acidez do meio que deve ser igualmente corrigida, de acordo com a enzima utilizada no processo. Assim, há proteases que apresentam o máximo de actividade em meio ácido, isto é, a pH inferior a 7 (caso da pepsina), outras em condições de neutralidade (pH 7), como a papaína, e outras ainda que exigem um meio alcalino, pH superior a 7, como, por exemplo, a tripsina.

Outro aspecto importante a considerar durante a hidrólise é o controlo da potencial contaminação por microrganismos, em particular os patogénicos. O problema da contaminação pode ser minimizado através de um rápido processamento, de um controlo do pH e da temperatura e da estrita observância de condições sanitárias.

De um modo sucinto, pode dizer-se que a realização da hidrólise enzimática deve processar-se num equipamento isolado termicamente, dispondo de um agitador mecânico e que permita o controlo da temperatura e do pH, através da adição de ácido ou base.

Como seguir o processo de hidrólise?

Na hidrólise das proteínas ocorre a rotura das ligações entre os aminoácidos, as suas unidades constituintes, pelo que a evolução do processo pode ser seguida através da medição do número de ligações que se rompem e exprime-se pelo grau de hidrólise (GH). Isto é, a relação percentual entre o número de ligações entre os aminoácidos da cadeia proteica que foram quebradas e o número inicial de ligações. Deste modo, um elevado grau de hidrólise significa a rotura de um grande número de ligações e, por conseguinte, a formação de muitos aminoácidos livres ou de péptidos de cadeia curta.



Evolução do grau de hidrólise (GH) em função do tempo de hidrólise e da concentração de enzima.

Na figura junto apresenta-se a evolução típica do grau de hidrólise atingido na preparação de hidrolisados de músculo de pescada, usando diferentes níveis de alcalase e após vários tempos de hidrólise.

Quando se atinge o grau de hidrólise desejado, a enzima deve ser inativada para que a hidrólise das proteínas não

prossiga. A inativação pode ser conseguida por aquecimento ou por via química. No primeiro caso o hidrolisado é aquecido a temperaturas entre 75 e 100 °C durante 5 a 30 min, dependendo da estabilidade da enzima. Na inativação por via química, procede-se à alteração do pH do hidrolisado, uma vez que a actividade da enzima depende do pH. No caso, por exemplo, da maior parte das proteases ácidas, a neutralização da suspensão provoca a inativação.

Como recuperar a fracção hidrolisada da proteína?

No final da hidrólise é necessário separar o material hidrolisado que se encontra solubilizado e as proteínas não digeridas as quais podem ser utilizadas em rações para animais. Esta separação pode realizar-se por centrifugação ou filtração.



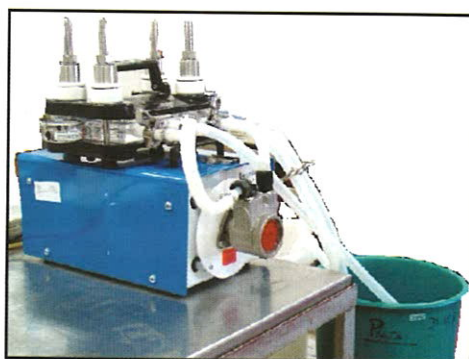
Centrífuga contínua.

A centrifugação permite também eliminar a larga maioria dos lípidos presentes. Porém, se o teor em óleo for elevado, torna-se necessário proceder a uma segunda centrifugação a fim de limitar a sua presença nos hidrolisados, considerando-se que deve ser inferior a 0,5 %. Na filtração pode recorrer-se a diferentes sistemas, tais como terra de diatomáceas, filtração cruzada, etc.

A ultrafiltração tem sido igualmente utilizada para recuperar os hidrolisados, mas é necessário que não apresentem lípidos. A principal vantagem da ultrafiltração é permitir a obtenção de hidrolisados com péptidos de tamanho relativamente uniforme.

Nalguns casos tem-se procedido à desodorização e descoloração dos hidrolisados, recorrendo a um tratamento com carvão activado o qual permite eliminar muitas substâncias indesejáveis.

Os hidrolisados proteicos são usualmente comercializados secos, utilizando então diferentes tipos de equipamentos como secadores de tambor ('drum/roller dryers'), liofilizadores ('freeze dryers') ou atomizadores ('spray dryers').



Equipamento de ultrafiltração.

Como caracterizar os hidrolisados proteicos?

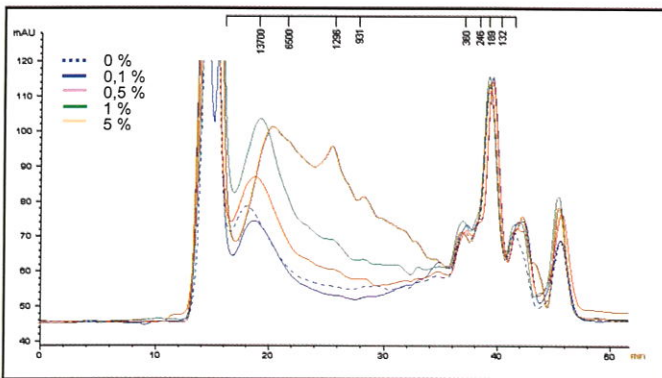
A composição química dos hidrolisados proteicos depende da matéria prima utilizada e da técnica seguida na sua produção.

Na tabela seguinte apresenta-se a gama de variação dos principais constituintes de hidrolisados proteicos de pescado secos.

Composição química típica de hidrolisados proteicos de pescado.

Humidade (%)	3 – 8
Proteína (%)	70 – 87
Gordura (%)	1 – 23
Cinza (%)	2 – 9
Fósforo (%)	0,4 – 0,8
Cálcio (%)	0,1 – 0,8
Cloretos (%)	2 – 3
Ferro (mg/kg)	40 – 50

Os hidrolisados proteicos são constituídos por um grande número de diferentes péptidos, dependendo a sua distribuição, por massas moleculares, da enzima



Distribuição de massas moleculares (Da) de hidrolisados proteicos preparados com diferentes concentrações de enzima. Na barra superior apresentam-se as massas moleculares de péptidos e proteínas usados como referência. Observar as diferenças na distribuição dos péptidos dos vários hidrolisados entre 13700 e 900 Da.

utilizada na preparação e do tempo de hidrólise. Para caracterizar esta distribuição dos péptidos pode recorrer-se a técnicas cromatográficas, apresentando-se na figura junto o aspecto de um cromatograma de hidrolisados obtidos com 0,1, 0,5, 1 e 5 % de enzima.

Como se podem apresentar?

Os hidrolisados podem apresentar-se sob a forma de um pó fino, cuja cor pode variar desde uma tonalidade esbranquiçada até tons relativamente escuros, dependendo da matéria-prima usada na preparação. Podem igualmente ser comercializados sob a forma líquida, destinando-se neste caso a aplicações especiais.



Hidrolisado líquido de peixe para a alimentação animal.



Aspecto de um hidrolisado seco.

Quais as utilizações dos hidrolisados proteicos?

Os hidrolisados proteicos de peixe têm sido utilizados principalmente em rações e em meios de cultura bacterianos.

Alimentação animal

Na alimentação animal, destaca-se a sua aplicação em

- Substitutos do leite para a alimentação de animais jovens
- Rações para camarões e peixes, em particular, alevins e juvenis

Os hidrolisados proteicos têm sido utilizados na alimentação de peixes, tendo em vista os seguintes efeitos nas características das rações:

- ◆ Melhorar as propriedades físicas
- ◆ Aumentar o valor nutricional
- ◆ Exercer um efeito atrator
- ◆ Melhorar o sabor



Dos estudos realizados em nutrição de peixes, é de destacar que a incorporação de hidrolisados proteicos nas rações levou a um aumento do crescimento e da ingestão de alimento em:

- ▶ Carpa
- ▶ Robalo
- ▶ Salmonídeos



De um modo geral, verifica-se que os hidrolisados proteicos:

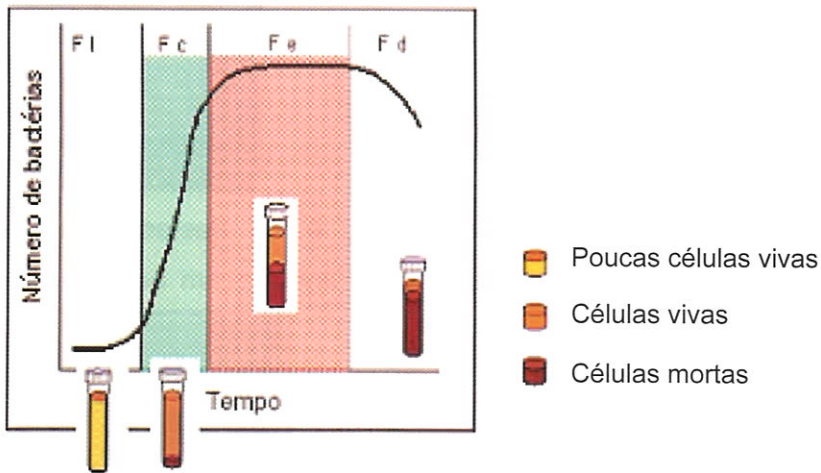
- Estimulam o consumo da ração
- Apresentam elevada digestibilidade
- Permitem uma boa utilização da ração para o crescimento

Quais as utilizações dos hidrolisados proteicos?

Meios de cultura bacterianos

Os hidrolisados constituem uma fonte de azoto, elemento indispensável para o crescimento bacteriano, tendo sido utilizados em meios de cultura para a produção de:

- Biomassa, com resultados comparáveis aos obtidos com hidrolisados provenientes de proteínas de leite, carne e vegetais;
- Metabolitos, como por exemplo: poli- β -hidroxibutirato, um composto substituto do plástico, e a γ -deca-lactona, produto utilizado como saborante.



Os metabolitos são produzidos na fase de crescimento exponencial ou na fase estacionária.

FI – fase de latência

Fc – fase de crescimento exponencial

Fe – fase estacionária

Fd – fase de decréscimo

Os hidrolisados proteicos têm alguma vantagem em relação às farinhas de peixe?

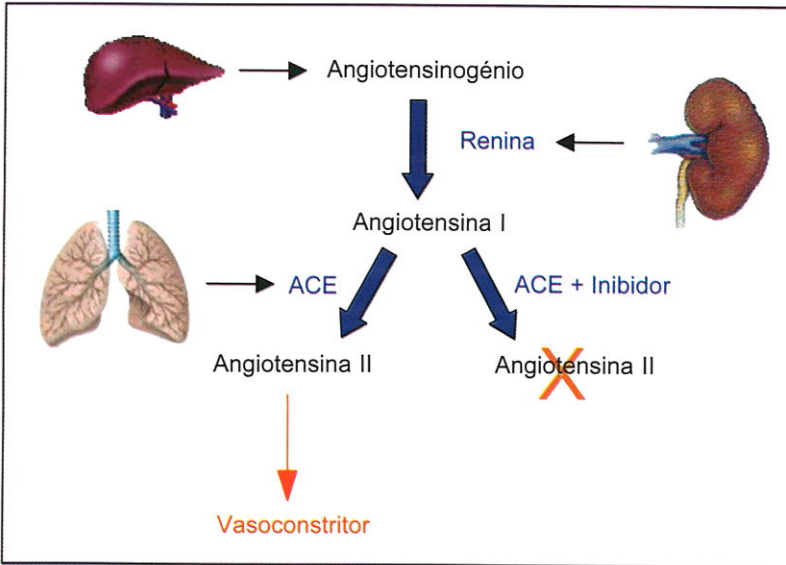
Os hidrolisados proteicos de pescado, em termos das suas propriedades nutricionais, são considerados dos melhores em comparação com os obtidos a partir de proteínas do leite, carne e vegetais. Efectivamente, apresentam uma composição equilibrada de aminoácidos e uma elevada digestibilidade, sendo usados fundamentalmente em nutrição animal em virtude do sabor amargo e do cheiro a peixe. Porém, os hidrolisados proteicos de pescado apresentam também um conjunto de propriedades biológicas que têm sido testadas em ensaios a nível laboratorial e que as farinhas de peixe não exibem.

Assim, nos hidrolisados proteicos de pescado têm sido detectadas as seguintes actividades biológicas:

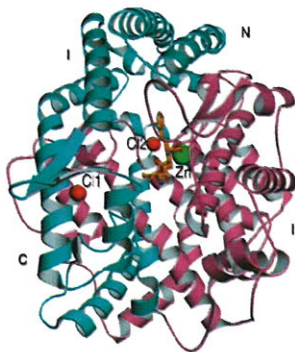
- Hipotensivas
- Reguladoras da actividade hormonal
- Estimulantes do crescimento
- Antioxidantes
- Antiproliferativas de células cancerosas
- Imunoestimulantes
- Hipocolesterolémicas

● Regulação da tensão arterial

Nos hidrolisados proteicos de peixe encontra-se um importante grupo de pequenos péptidos (com 2 a 13 aminoácidos) que apresentam propriedades hipotensivas. O efeito hipotensivo destes péptidos deve-se ao facto de actuarem como inibidores da ACE (Angiotensin Converting Enzyme), uma enzima que converte a angiotensina I em angiotensina II que é um vasoconstritor e também um inibidor da bradiquinina (um vasodilatador).



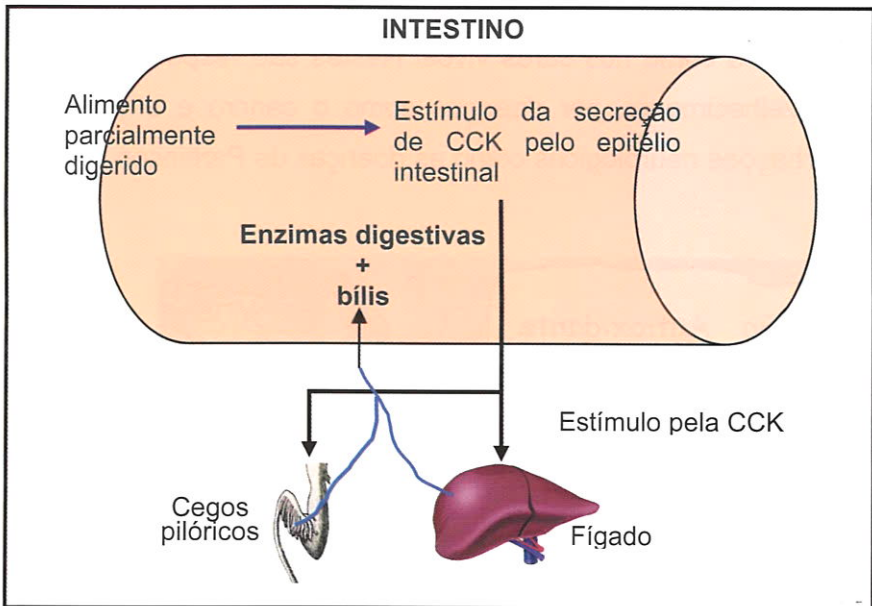
Esquema da conversão da angiotensina I em angiotensina II e efeito da inibição da ACE.



Estrutura da Enzima
Conversora da Angiotensina

● *Regulação da actividade hormonal*

Os hidrolisados proteicos de peixe, em particular os de sardinha, exibem actividade biológica relacionada com a de hormonas calcitrópicas, em particular com a “Calcitonin Gene Related Peptide” (CGRP), a gastrina e a colescistoquinina (CCK). A CGRP é um neurotransmissor associado ao controlo de diversas funções fisiológicas enquanto que a gastrina e a CCK estimulam a secreção de enzimas digestivas e aumentam a motilidade intestinal, apresentando, por conseguinte, grande interesse em alimentação de animais sãos.



Efeito da colescistoquinina (CCK) na digestão.

Nos hidrolisados de peixe foi também detectada actividade de péptidos do mesmo tipo que a dos factores de crescimento, em particular, nas fracções menos hidrolisadas, isto é, com maiores massas moleculares. Os factores de crescimento são definidos como um conjunto diversificado de agentes reguladores de natureza polipeptídica. Estes agentes controlam a actividade celular através de uma série de mecanismos análogos ao das hormonas endócrinas.

● **Actividade antioxidante**

Os hidrolisados proteicos de pescado têm revelado poder antioxidante e apresentam efeito sinérgico na presença de outros antioxidantes. Esta actividade antioxidante depende de:

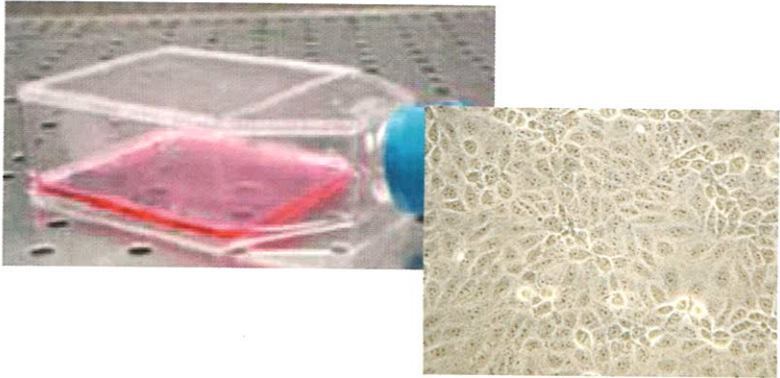
- Natureza da matéria prima utilizada na preparação
- Grau de hidrólise dos produtos.

Os antioxidantes são substâncias com capacidade para prevenir ou eliminar a formação de compostos oxidados que se formem tanto em produtos alimentares como nos seres vivos. Nestes são responsáveis pelos processos de envelhecimento, por doenças como o cancro e a diabetes e ainda por perturbações neurológicas como as doenças de Parkinson e Alzheimer.

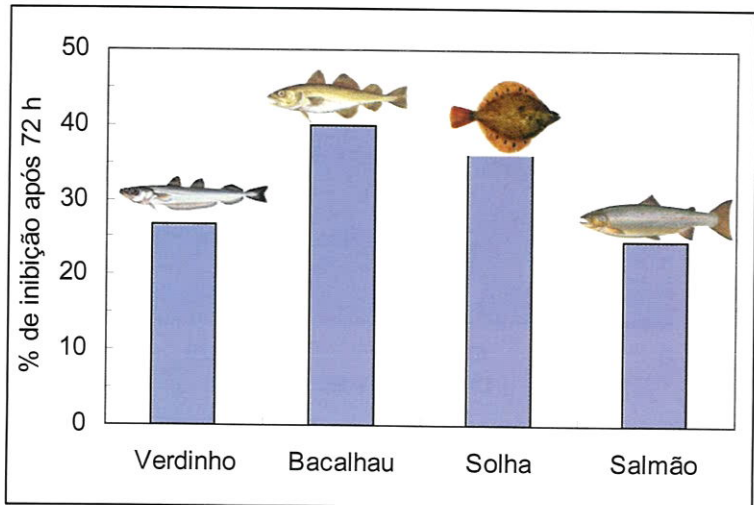


● **Actividade anticancerígena**

A actividade anticancerígena de hidrolisados de peixe foi testada em culturas de células cancerosas, tendo-se verificado que apresentavam um bom efeito inibidor da sua proliferação. Porém, os hidrolisados são uma mistura complexa, não se conhecendo ainda quais os péptidos responsáveis por aquela actividade.



Microfotografia de células cancerosas.



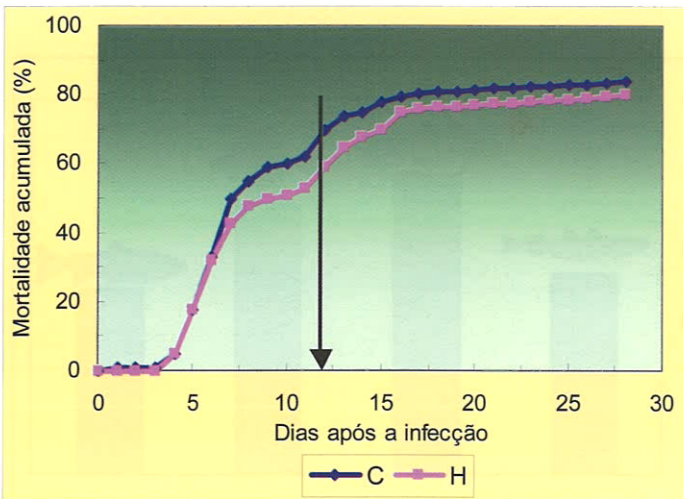
Efeito de hidrolisados proteicos de peixe na inibição do crescimento de células cancerosas. Resultados amavelmente cedidos pelo Dr. Laurent Picot da Universidade de La Rochelle.

● **Actividade imunoestimulante**

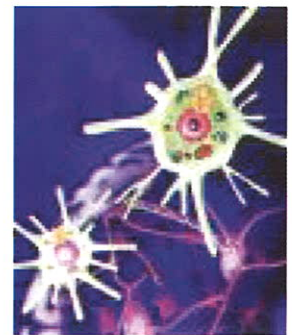
O recurso a métodos profiláticos, tais como a utilização de imunoestimulantes, tem merecido especial atenção em sanidade animal, permitindo assim limitar a utilização de antibióticos.

A utilização de hidrolisados de bacalhau em rações para salmão mostrou que estimulavam a actividade dos macrófagos, isto é, células que se caracterizam pela sua capacidade de fagocitar e degradar material particulado. Verificou-se também que esta actividade era devida a algumas fracções de pequenos péptidos presentes nos hidrolisados.

Na figura junto apresentam-se os resultados de um estudo com alevins de bacalhau no qual um lote de peixes foi alimentado com uma ração suplementada com péptidos imunoestimulantes e outro com a ração controlo. Os alevins, três semanas após terem sido alimentados com as duas rações, foram infectados com *Vibrio anguillarum*. Doze dias após a infecção, verificou-se que a mortalidade acumulada era inferior no lote dos alevins alimentados com a ração suplementada com os hidrolisados imunoestimulantes.



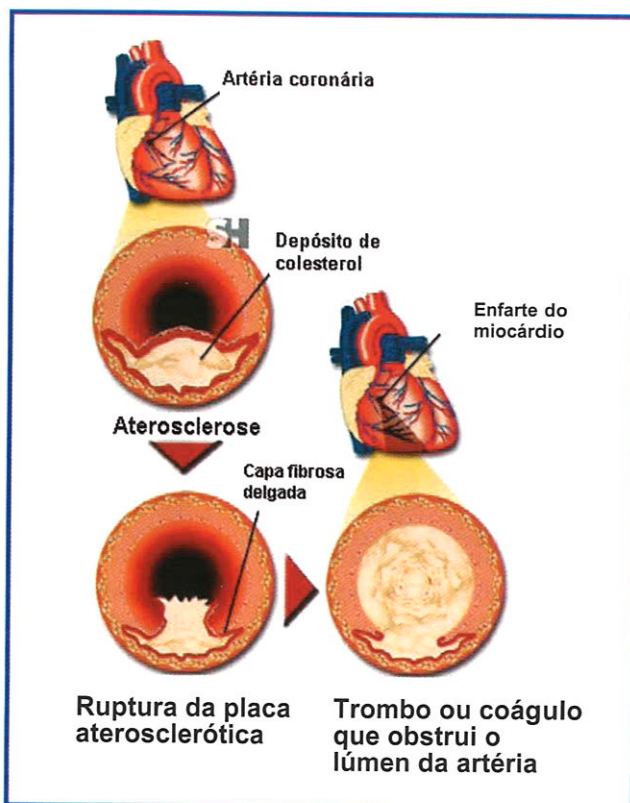
Mortalidade acumulada de peixes alimentados com a ração controlo (C) e com a ração contendo hidrolisados imunoestimulantes (H). Adaptado de Gildberg e Mikkelsen (1998).



Aspecto de um macrófago.

Efeito hipocolesterolémico

A ocorrência de elevados níveis de colesterol no plasma está associada ao desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares as quais constituem a principal causa de morte na Europa. Em estudos realizados com ratos, verificou-se que os hidrolisados proteicos de peixe apresentavam um efeito hipocolesterolémico. Registrou-se, de igual modo, um aumento da proporção do colesterol ligado às lipo-proteínas de alta densidade (HDL) as quais não se depositam nas paredes dos vasos sanguíneos. Mostrou-se ainda neste estudo que a diminuição dos níveis de colesterol no plasma, provocada pelos hidrolisados seria devida à redução da actividade de uma enzima que está envolvida na progressão da aterosclerose.



Formação de uma placa de ateroma nas coronárias.

Os hidrolisados proteicos já são produzidos industrialmente?

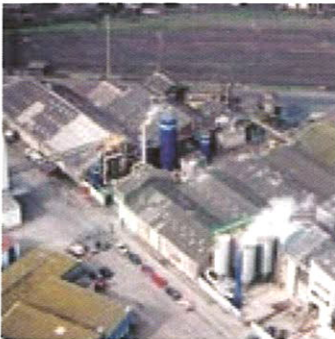
A produção comercial de hidrolisados proteicos de pescado em todo o mundo é ainda limitada, apresentando-se a seguir os 'sites' na Internet de diversas unidades de produção tanto de hidrolisados como de extracção de diversos produtos de origem marinha, localizadas na Europa e no Canadá.

www.ctpp.fr - Coopérative de Traitement de Produits de la Pêche (CTPP), localizada em Boulogne-sur-Mer (França).

www.primex.is - Primex Marine Biotechnology, localizada em Siglufjordur (Islândia).

www.forsk.dk/portal/page - Danish Fish Protein, Marinova, localizada em Højmark (Dinamarca).

www.oceanbiosource.com/default.htm - Ocean Biosource Inc. (OBI), localizada em Vancouver, British Columbia (Canadá).



Instalação fabril de extracção de produtos marinhos.



Evaporador, à escala piloto, utilizado na recuperação de produtos de origem marinha.

Para saber mais:

Obras gerais

- Adler-Nissen, J., 1986. In *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Novo Industri S/A, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 427 p.
- Kristinsson, H. G.; Rasco, B. A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40(1): 43–81.
- Sainclivier, M. 1983. In *L'industrie alimentaire halieutique vol.1: Le poisson matière première*. Sciences agronomiques Editeur, Rennes, 263 p.

Valor nutricional

- Berge, G. M.; Storebakken, T., 1996. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145, 205-212.
- Cahu, C. L.; Zambonino Infante, J. L.; Quazuguel, P.; Le Gall, M. M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171, 109-119.
- Carvalho, A. P.; Escaffre, A.-M.; Oliva Teles, A.; Bergot, P., 1995. Growth and survival of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae fed high levels of protein and hydrolysates. LARVI'95 – FISH & SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM. P. Lavens, E. Jaspers, and I. Roelants (Eds) European Aquaculture Society, Special Publication No. 24, Gent, Belgium. p. 255-271.
- Carvalho, A. P.; Escaffre, A.-M.; Oliva Teles, A.; Bergot, P., 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquaculture International*, 5, 361-367.
- Murray, A. L.; Pascho, R. J.; Alcorn, S. W.; Fairgrieve, W. T.; Shearer, K. D.; Roley, D., 2003. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 220, 643-653.
- Oliva-Teles, A.; Cerqueira, A. L.; Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 179, 195-201.
- Pigott, G. M., 1997. Enzyme hydrolysis of fish waste for animal feed and fertilizer. In *Seafood safety, processing, and biotechnology*. (F. Shahidi, Y. Jones and D. D. Kitts eds.) Technomic Co. Inc. Lancaster, USA. p. 249-258.
- Refstie, S.; Olli, J. J.; Standal, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239, 331-349.
- Zambonino Infante, J. L.; Cahu, C. L.; Peres, A., 1996. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *The Journal of Nutrition*, 127 (4), 608-614.

Meios de cultura bacterianos

- Clausen, E.; Gildberg, A.; Raa, J., 1985. Preparation and Testing of an Autolysate of Fish Viscera as Growth Substrate for Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (6), 1556-1557.

- De La Broise, D.; Dauer, G.; Gildberg, A.; Guérard, F., 1998. Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on *Escherichia coli* culture kinetics. *J Mar Biotechnol*, 6, 111-115.
- Dufossé, L.; De La Broise, D.; Guérard, F., 1997. Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Recent Res. Devel. in Microbiology*, 1, 365-381.
- Dufossé, L.; De La Broise, D.; Guérard, F., 2001. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modelling of microbial growth. *Current Microbiology*, 41, 32-38.
- Gildberg, A.; Batista, I.; Strøm, E., 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 11, 413 - 423.
- Vecht-Lifshitz, Susan E.; Almas, K. A.; Zomer, E., 1990. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 183-186.

Actividade inibidora da ACE

- Bordenave, S.; Fruitier, I.; Ballandier, I.; Sannier, F.; Gildberg, A.; Batista, I.; Piot, J. M., 2002. HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on guinea pig ileum and ACE activity. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32 (1), 65-77.
- Matsufuji, H.; Matsui, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Nakashima, M.; Osajima, Y., 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 (12), 2244-2245.
- Matsui, T.; Matsufuji, H.; Seki, E.; Sajima, K.; Nakashima, M.; Osajima, Y., 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (6), 922-925
- Suetsuna, K.; Yamagami, M.; Kuwata, K., 1988. Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 (10), 1853.

Ação reguladora da actividade hormonal e factores de crescimento

- Cancre, I.; Ravallec, R.; Van Wormhoudt, A.; Stenberg, E.; Gildberg, A.; Le Gal, Y., 1999. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Mar. Biotechnol.* 1, 489 – 494.
- Fouchereau-Peron, M.; Duvail, L.; Michel, C.; Gildberg, A.; Batista, I.; Le Gal, Y., 1999. Isolation of an acid fraction from a fish protein hydrolysate with a CGRP-like biological activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 87-92.
- Ravallec-Plé, R.; Charlot, C.; Pires, C.; Braga, V.; Batista, I.; Van Wormhoudt, A.; Le Gal, Y.; Fouchereau-Péron, M., 2001. Presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from enzymatic processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (11), 1120-1125.
- Rousseau, M.; Batista, I.; Le Gal, Y.; Fouchereau-Peron, M., 2001. Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysates. *Electron J Biotechnol* 2001; 4 (April (1)) [disponível em <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue1>]

Actividade antioxidante

- Amarowicz, R.; Karamac, M.; Shahidi, F., 1999. Synergistic activity of capelin protein hydrolysates with synthetic antioxidants in a model system. *Journal of Food Lipids*, 6, 271-275.
- Amarowicz, R.; Shahidi, F., 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem*, 58(4), 355–359.
- Hatate, H.; Numata, Y.; Kochi, M., 1990. Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolyzates with antioxidants. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 56 (6), 1011.
- Sathivel, S.; Bechtel, P. J.; Babbitt, J.; Smiley, S.; Crapo, C.; Reppond, K. D.; Prinyawiwatkul, W., 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *J Fd Sci*, 68 (7), 2196-2200.
- Shahidi, F.; Han, X.-Q.; Synowiecki, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53, 285 – 293.
- Wu, H. C.; Chen, H. M.; Shiau, C. Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Intern*, 36, 949–957.

Actividade anticancerígena

- Picot, I.; Bordenave, S.; Didelot, S.; Fruitier-Arnaudin, I.; Sannier, F.; Thorkelsson, G.; Bergé, J. P.; Guérard, F.; Chabeaud, A.; Piot, J. M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41, 1217-1222.

Actividade imunoestimulante

- Gildberg, A.; Bøgwald, J.; Johansen A.; Stenberg, E., 1996. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114B (1), 97-101.
- Gildberg, A.; Johansen, A.; Bøgwald, J., 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysates and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138, 23-34.
- Gildberg, A.; Mikkelsen, H., 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 167, 103-113.

Actividade hipocolesterolémica

- Wergedahl, H.; Liaset, B.; Gudbrandsen, O. A.; Lied, E.; Espe, M.; Muna, Z.; Mork, S., Berge, R.K. 2004. 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. *J Nutr*, 134, 1320–1327.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração da Eng.^a Patrícia Fradinho na elaboração das figuras deste documento.

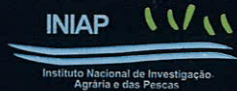
APOIO

Este trabalho foi elaborado e financiado no âmbito do projecto VALBIOMAR (Valorisation Biotechnologique des Ressources Marines). Community Initiative Programme INTERREG «Atlantic Area».





Ministério da Agricultura,
Pescas e Florestas



Instituto Nacional de Investigação
Agrária e das Pescas