

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**TESE**

**Aplicação de alta pressão hidrostática para melhoria do processo de  
hidrólise das proteínas do soro de leite utilizando diferentes proteases**

**Ana Paula Miguel Landim**

**2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**APLICAÇÃO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA PARA MELHORIA  
DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE  
LEITE UTILIZANDO DIFERENTES PROTEASES**

**ANA PAULA MIGUEL LANDIM**

*Sob a Orientação do Doutor*  
**Amauri Rosenthal**

*E co-orientação da Doutora*  
**Caroline Mellinger Silva**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração Ciências de Alimentos

Seropédica, RJ  
Maio de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L243a Landim, Ana Paula Miguel , 1992-  
Aplicação de alta pressão hidrostática para  
melhoria do processo de hidrólise das proteínas do soro  
de leite utilizando diferentes proteases. / Ana Paula  
Miguel Landim. - Bom Jardim de Minas, 2021.  
103 f.

Orientador: Amauri Rosenthal.  
Coorientadora: Caroline Mellinger Silva.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
2021.

1. hidrolisados proteicos. 2. hidrólise enzimática.  
3. capacidade antioxidante in vitro. 4. atividade  
anti-hipertensiva. I. Rosenthal, Amauri , 1960- ,  
orient. II. Silva, Caroline Mellinger, 1976- ,  
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

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



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS



TERMO Nº 550/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.036548/2021-53

Seropédica-RJ, 28 de maio de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANA PAULA MIGUEL LANDIM

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de doutora, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Tese APROVADA EM 24/05/2021.

AMAURI ROSENTHAL (Dr) EMBRAPA (orientador)  
ANA CARLA KAWAZOE SATO (Dra) UNICAMP  
LOURDES MARIA PESSOA MASSON (Dra) IFRJ  
JULIA HAUCK TIBURSKI (Dra) UFRRJ  
JOSE LUCENA BARBOSA JUNIOR (Dr) UFRRJ.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 28/05/2021 17:36)*

JOSE LUCENA BARBOSA JUNIOR  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)  
Matrícula: 2455049

*(Assinado digitalmente em 31/05/2021 12:31)*

JULIA HAUCK TIBURSKI  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DTA (12.28.01.00.00.00.46)  
Matrícula: 2230482

*(Assinado digitalmente em 02/06/2021 14:40)*

LOURDES MARIA PESSOA MASSON  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 545.453.407-25

*(Assinado digitalmente em 29/05/2021 10:02)*

AMAURI ROSENTHAL  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 025.072.978-40

*(Assinado digitalmente em 16/07/2021 13:15)*

ANA CARLA KAWAZOE SATO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 291.011.368-01

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Roberto e Cecília, e demais familiares e  
amigos, pelo constante estímulo, pelo  
apoio incondicional, pelo carinho e  
companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

Sempre agradeço a Deus por toda bondade, proteção e bênçãos concedidas a mim.

Aos meus pais, Roberto e Cecília, pelo constante incentivo e amor incondicional. Agradeço por sempre acreditarem e apoiarem todos os meus sonhos. Amo vocês.

Ao Ramiro, meu amigo e companheiro, que esteve sempre ao meu lado e foi um importante ponto de equilíbrio.

Ao meu orientador Dr. Amauri e a co-orientadora Dra. Caroline, que foram sempre pessoas maravilhosas e exemplos de profissionalismo e dedicação. Sou grata por terem me acompanhado, orientado, compartilhado inúmeros ensinamentos, sempre prezando pela cordialidade e, principalmente, pelo respeito.

Aos queridos Alex, Jeane e Tatiana que foram sempre muito solícitos no laboratório de bioquímica. Agradeço o companheirismo, força e ajuda, contribuindo fortemente para a realização da Tese.

Aos técnicos e analistas da Embrapa William, Henriqueta e Érika por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de realização do projeto em suas instalações.

Ao Dr. José Eduardo Silva Santos e Natália Kimie Matsubara da Universidade Federal de Santa Catarina pela parceria realizando os ensaios biológicos.

A todos os meus amigos do alojamento. Vocês são pessoas incríveis e foram fundamentais nessa jornada. Obrigada pela amizade e companheirismo. Sinto muita saudade de todos vocês!!!

Concluir este trabalho foi uma verdadeira jornada. Uma jornada que exigiu muita resiliência, dedicação e determinação, mas que também foi muito enriquecedora, com experiências incríveis, as quais contribuíram imensamente para o meu crescimento pessoal e profissional. E de tudo isso, fica a certeza de que sozinhos não somos nada, por isso sou eternamente grata por todos que cruzaram meu caminho e que, de algum modo, contribuíram para a finalização desta Tese. Obrigada por tanto!!!

*“Aqueles que passam por nós, não vão  
sós, não nos deixam sós. Deixam um  
pouco de si, levam um pouco de nós.”  
Antoine de Saint-Exupér*

## RESUMO GERAL

LANDIM, Ana Paula Miguel. **Aplicação de alta pressão hidrostática para melhoria do processo de hidrólise das proteínas do soro de leite utilizando diferentes proteases.** 2021. 87p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O soro de leite é um coproduto da indústria de lácteos, com alto teor de proteínas de elevado valor nutricional e diferentes propriedades tecnológicas, usado em uma ampla variedade de produtos. No entanto, essas características podem ser melhoradas por processos enzimáticos, que também conseguem liberar peptídeos bioativos e reduzir a alergenicidade em relação à proteína nativa. Vários fatores podem influenciar na hidrólise, como a enzima selecionada, o pH da reação, o tempo de processo, o uso de tecnologias, dentre outros. A tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) vem sendo associada a hidrólise devido às alterações que pode provocar na estrutura da proteína, resultando no aumento da exposição de pontos de clivagem e, conseqüentemente, uma hidrólise mais intensa e, possivelmente, hidrolisados com maior bioatividade e menor alergenicidade. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da APH na hidrólise de um concentrado proteico do soro de leite (WPC) utilizando as proteases Novo Pro-D, ficina e pepsina. A Tese foi dividida em dois capítulos de resultados. O primeiro estudo (capítulo II) avaliou o efeito da aplicação da APH na hidrólise péptica do WPC. O uso da APH foi avaliada antes (pré-tratamento - PT) e durante os processos de hidrólise (assistida por hidrólise – HA) combinando as pressões de 100, 250 e 400 MPa e os tempos de 5, 20 e 35 min. A evolução da hidrólise nos diferentes tratamentos (hidrólise convencional, HA e PT) foram avaliadas por meio da redução do teor de proteínas solúveis, aumento do teor de aminoácidos aromáticos e perfil peptídico. Além disso, a capacidade antioxidante dos hidrolisados também foram avaliados utilizando-se os ensaios ORAC e ABTS. O uso da APH favoreceu a hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina em até 98%, mesmo sendo uma proteína resistente à hidrólise péptica. A maior redução de proteínas solúveis foi observada no tratamento de HA usando 100 MPa/35 min., em que exibiu redução de 35%, enquanto na CH e nos PTs a redução foi de cerca de 20% após 4h de reação. Quanto a bioatividade, o uso da APH contribuiu para obtenção de hidrolisados com maior capacidade antioxidante *in vitro* quando comparado ao obtido no processo convencional. Os resultados desse capítulo sugeriram que a HA por APH é uma estratégia eficiente para melhorar a hidrólise péptica, reduzir significativamente o tempo de processo e aumentar a atividade antioxidante dos hidrolisados. No capítulo III da Tese, foi investigado o uso das proteases Novo Pro-D® (NPD) e ficina (FC) como alternativa para a produção de hidrolisados. Como são proteases pouco estudadas na produção de hidrolisados, foi feito um estudo prévio avaliando as relações E:S de 7, 5, 3 e 1% para NPD e 10, 7 e 5% para FC. A melhor relação E:S foi de 1% para NPD e 7% para FC. Após, a hidrólise foi realizada nas proteínas pré-tratadas por APH, utilizando as mesmas condições de pressurização do capítulo II. O efeito do PT, bem como o uso das diferentes proteases foram avaliados pela caracterização química (teor de proteínas solúveis, aminoácidos aromáticos e perfil peptídico). Além disso, foram avaliadas a capacidade antioxidante *in vitro* usando o ensaio ORAC, a atividade anti-hipertensiva *ex-vivo* por meio do relaxamento vascular, e a alergenicidade *in vitro* pelo teste ELISA. A enzima NPD apresentou uma hidrólise mais acentuada das proteínas do soro de leite, gerando hidrolisados com redução de 98% de proteínas solúveis, maior capacidade antioxidante e menor imunorreatividade quando comparado a FC. No entanto, o pré-tratamento por APH conseguiu melhorar as características dos hidrolisados obtidos pela

FC, e os tratamentos PT2 (400 MPa/5 min.) e PT4 (400 MPa/35 min) resultaram na redução de 68.81 e 85.29% de proteínas, respectivamente, enquanto na hidrólise convencional a redução foi de 56,9%. Além disso, os hidrolisados pré-tratados por APH também apresentaram maior capacidade antioxidante e menor alergenicidade em comparação aos obtidos na hidrólise convencional. Em relação à atividade anti-hipertensiva, o hidrolisado proveniente da hidrólise usando a FC causou relaxamento vascular muito mais pronunciado em anéis aórticos de ratos do que os hidrolisados de NPD. Portanto, ambas enzimas (NPD e FC) apresentaram elevado potencial para produção de hidrolisados, e o uso de alta pressão hidrostática como pré-tratamento pode ser uma alternativa promissora para produzir hidrolisados com características melhoradas. Em suma, os resultados alcançados sugerem que as características desejadas nos hidrolisados devem ser os norteadores para seleção das proteases. Além disso, a APH foi um processo importante para melhorar a hidrólise das proteínas do soro de leite e as características finais dos hidrolisados, porém a melhor estratégia de uso dependerá da protease selecionada.

**Palavras chaves:** hidrolisados proteicos; hidrólise enzimática; capacidade antioxidante *in vitro*; alergenicidade *in vitro*, atividade anti-hipertensiva



## ABSTRACT

LANDIM, Ana Paula Miguel. **Application of high hydrostatic pressure to improve the whey protein hydrolysis process using different proteases.** 2021.87p. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Whey is a co-product of the dairy industry, with a high content of high nutritional value proteins and different technological properties, being used in a wide variety of products. However, these characteristics can be improved by enzymatic processes, which are also able to release bioactive peptides and reduce allergy concerning the native protein. Several factors can influence hydrolysis, such as the selected enzyme, reaction pH, process time, use of technologies, among others. High hydrostatic pressure (HHP) technology has been associated with hydrolysis due to changes it can cause in the protein structure, resulting in increased exposure of cleavage points and, consequently, more intense hydrolysis and possibly hydrolysates with greater bioactivity and lower allergenicity. Given this, this study aimed to evaluate the effect of HHP on the hydrolysis of a whey protein concentrate (WPC) using the proteases Novo Pro-D, ficin, and pepsin. The Thesis was divided into two chapters of results. The first study (chapter II) evaluated the effect of the application of HHP on the peptic hydrolysis of WPC. The use of HHP was evaluated before (pre-treatment - PT) and during the hydrolysis processes (assisted hydrolysis - AH). In the different treatments, the combination of pressures of 100, 250, and 400 MPa and times of 5, 15, and 35 min were used. The evolution of hydrolysis in the different treatments (conventional hydrolysis, HA, and PT) was evaluated by reducing the soluble protein content, increasing the aromatic amino acid content and the peptide profile. Furthermore, the antioxidant capacity of the different hydrolysates was also evaluated using the ORAC and ABTS assays. The use of HHP favored the hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by up to 98%, even though it is a protein resistant to peptic hydrolysis. In the HA treatment at 100 MPa/35 min., it exhibited a 35% reduction in soluble proteins, while in CH and PTs the reduction was about 20% after 4h of reaction. As for bioactivity, the use of HHP contributed to obtaining hydrolysates with greater antioxidant capacity *in vitro* than that obtained in the conventional process. The results of this chapter suggested that HA by HHP is an efficient strategy to improve peptic hydrolysis, significantly reduce processing time and increase the antioxidant activity of hydrolysates. In chapter III of the Thesis, the use of the proteases Novo Pro-D® (NPD) and ficin (FC) as an alternative for the production of hydrolysates was investigated. As they are few studied proteases in the production of hydrolysates, a previous study was carried out evaluating the E:S ratios of 7, 5, 3, and 1% for NPD and 10, 7, and 5% for FC. The best E:S ratio was 1% for NPD and 7% for FC. After choosing the best E:S ratio, hydrolysis was performed on the HHP-pretreated proteins, using the same pressurization conditions described above. The effect of PT, as well as the use of different proteases, were evaluated by chemical characterization (the content of soluble proteins, aromatic amino acids, and peptide profile). In addition, the antioxidant capacity *in vitro* using the ORAC assay, the antihypertensive activity *ex vivo* using vascular

relaxation, and the allergenicity *in vitro* using the ELISA assay. The NPD enzyme showed more pronounced hydrolysis of whey proteins, generating hydrolysates with a 98% reduction in soluble proteins, greater antioxidant capacity, and lower immunoreactivity when compared to FC. However, the pre-treatment by APH was able to improve the characteristics of the hydrolysates obtained by FC, and the treatments that were used 400 MPa/5 min. and 400 MPa/35 min. resulted in a reduction of 68.81 and 85.29% of proteins, respectively, while in conventional hydrolysis the reduction was 56.9%. In addition, the hydrolysates pre-treated by APH also showed higher antioxidant capacity and lower allergenicity compared to those obtained from conventional hydrolysis. Regarding antihypertensive activity, the hydrolyzate from hydrolysis using FC caused vascular relaxation much more pronounced in rat aortic rings than the NPD hydrolysates. Both enzymes (NPD and FC) showed high potential for hydrolyzate production, and the use of high hydrostatic pressure as a pre-treatment, may be a promising alternative to produce hydrolyzates with improved characteristics. In short, the results achieved suggest that the desired characteristics in the hydrolysates should be the guidelines for selecting the proteases. In addition, APH was an important process to improve the hydrolysis of whey proteins and the final characteristics of the hydrolysates, but the best use strategy will depend on the selected protease.

**Keywords:** protein hydrolysates; enzymatic hydrolysis; *in vitro* antioxidant capacity; *in vitro* allergenicity, antihypertensive activity

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Exemplos de produtos proteicos produzidos a partir do soro de leite comercialmente disponível no Brasil.....6
- Figura 2** - Estrutura tridimensional da  $\beta$ -Lg bovina (Fonte: RSCB Protein Data Bank, 2020).....8
- Figura 3** - Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -La bovina (Fonte: RSCB Protein Data Bank, 2020).....9
- Figura 4** - Representação dos diferentes níveis estruturais das proteínas e efeito da alta pressão hidrostática na estrutura e conformação das proteínas.....13
- Figura 5** – Estratégias de uso da APH para melhorar a hidrólise enzimática. A) Pré-tratamento das proteínas seguida de hidrólise enzimática (pré-tratamento – PT); B) tratamento de APH simultânea à hidrólise enzimática (hidrólise assistida - HA) e C) hidrólise convencional a pressão ambiente (Fonte: Adaptado de MARCINIAK *et al.*, 2018).....15
- Figura 6** - Principais enzimas utilizadas nos estudos que avaliaram o efeito da APH na hidrólise enzimática que são apresentadas na Tabela 3.....17
- Figura 7** – Mecanismos de ação dos peptídeos anti-hipertensivo (A); esquema da regulação da pressão arterial pelos sistemas renina-angiotensina (B) e caliceína-cinina (C) (Fonte: adaptado de GOMES *et al.*, 2020).....19

### CAPÍTULO II - EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND PEPTIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEIN

- Figure 1** - Whey protein hydrolysis curves after conventional hydrolysis (CH) and HHP-pretreated (PT) evaluated by (A) soluble protein content; (B) aromatic amino acid content, at the different times of process and response surface graphs for the effect of HHP on assisted hydrolysis (AH) in the different conditions of the experimental planning for (C) soluble protein content and (D) aromatic amino acid content. PT1 = 100 MPa /35 minutes; PT2 = 400 MPa/5 minutes; PT3 = 100 MPa/ 35 minutes; PT4 = 400 MPa/35 minutes; PT5 = 250 MPa/20 minutes. Treatments with different lowercase letters, at similar hydrolysis times, are significantly different from each other ( $P \leq 0.05$ ). Capital letters next to the legend indicate statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) between treatments.....43
- Figure 2** - RP-HPLC chromatograms of whey protein hydrolyzed by: (A) conventional hydrolysis (CH); (B) HHP-pretreated (PT) under different experimental design conditions (PT1 to PT5) after 180 min of hydrolysis and (C) hydrolysis assisted by HHP (AH) under the different conditions of the experimental design (AH1 to AH5). The hydrolysis times of each treatment are represented by T60...T240, varying the time between 60 and 240 min, respectively.  $\alpha$ -La = alpha-lactalbumin;  $\beta$ -Lg = beta-lactoglobulin. WPC C = control. Elution time for  $\alpha$ -La = 27.8 min;  $\beta$ -Lg = 28.5 min. Down arrows indicate the % reduction in the amount of  $\alpha$ -La (left side of chromatograms) and  $\beta$ -Lg (right side of chromatograms).....47
- Figure 3** – *In vitro* Antioxidant capacity of whey protein hydrolysates after conventional hydrolysis (CH) and HHP-pretreated (PT) evaluated by (A) ABTS assay, (B) ORAC assay, at the different process time. (C) response surface graphs for the effect of HHP on assisted hydrolysis (AH) of the WPC in the different conditions of the experimental planning for ABTS, and (D) ORAC responses. PT1 = 100 MPa /35 minutes; PT2 = 400 MPa/5 minutes; PT3 = 100 MPa/ 35 minutes; PT4 = 400 MPa/35 minutes; PT5 = 250 MPa/20 minutes.

Treatments with different lowercase letters, at similar hydrolysis times, are significantly different from each other ( $P \leq 0.05$ ). Capital letters next to the legend indicate statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) between treatments.....48

### CAPÍTULO III -APPLICATION OF PRELIMINARY HIGH-PRESSURE PROCESSING FOR IMPROVING BIOACTIVE CHARACTERISTICS AND REDUCING ANTIGENICITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES

**Figure 1.** Conventional hydrolysis regarding the content of soluble proteins (-) and aromatic amino acids (--) obtained by the treatment with Novo Pro-D® (A), Ficin (B). Treatment with the same lower case letters at the same hydrolysis time has no significant difference ( $p > 0.05$ ). FC: Ficin. NPD: Novo Pro-D®; FC10, FC7 and FC5: concentration of 10, 7 and 5%, respectively; NPD7, NPD5, NPD3 and NPD1: concentration of 7, 5, 3 and 1%, respectively.....58

**Figure 2** - Peptide profile of the hydrolysates obtained by treatment using Ficin (FC) and Novo Pro-D® (NPD).  $\alpha$ -La = alpha-lactalbumin;  $\beta$ -Lg = beta-lactoglobulin; WPC = whey protein concentrate. FC = Ficin. NPD = Novo Pro-D®; FC10, FC7 and FC5 = concentration of 10, 7 and 5%, respectively; NPD7, NPD5, NPD3 and NPD1 = concentration of 7, 5, 3 and 1%, respectively;  $T_{120}$  = 120-minute hydrolysis time and  $T_{15}$  = 15-minute hydrolysis time.....59

**Figure 3** - Content of soluble proteins (-) and aromatic amino acids (--) obtained by hydrolysis of WPC pretreated by HHP using Novo Pro-D® (A); Ficin (B). WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min.....61

**Figure 4** - Peptide profile of the hydrolysates obtained using the Novo Pro-D® and ficin at the times of 60 and 120 min respectively, in the different pressure levels and times used in the HHP-pretreatment. WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min.....62

**Figure 5** - *In vitro* antioxidant capacity of hydrolysates by using Novo Pro-D® (A) and Ficin (B) at different times of hydrolysis. WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min. Equal lowercase letters at the same processing time indicate that there was no significant difference between treatments ( $p > 0.05$ ).....63

**Figure 6** - Vascular relaxation induced by whey hydrolysates. Trace records of WPH-n FC and WPH-n NPD whey hydrolysates-induced vascular relaxation in endothelium-intact (A) and endothelium-denuded (B) rat aortic rings. The mean  $\pm$  SEM of vascular relaxation induced by WPH-n FC and WPH-n NPD in 5-6 preparations obtained from different animals are presented in panels C and D, respectively. Statistical analyzes were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple test. \* indicates  $p < 0.05$  compared with the basal tone; # indicates  $p < 0.05$  compared with the previous concentration in the same experimental group;  $\psi$  indicates  $p < 0.05$  compared with the E-group.....67

## APÊNDICE I

**Figura 1** - Gráficos de superfície de resposta para o efeito da APH na hidrólise assistida (HA) do WPC nas diferentes condições do planejamento experimental em relação ao teor de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos para Novo Pro-D® na coluna A e, para Ficina na coluna B.....92

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

<b>Tabela 1</b> - Características composicionais do soro de leite doce e soro de leite ácido .....	5
<b>Tabela 2</b> - Produtos lácteos e ingrediente comerciais com apelo funcional baseado em peptídeos bioativos.....	7
<b>Tabela 3</b> – Aplicação da APH como ferramenta para melhorar a hidrólise enzimática de proteínas alimentares, bem como as propriedades biológicas e alergênicas do hidrolisados....	25

### CAPÍTULO II - EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND PEPTIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEIN

<b>Table 1</b> - Experimental conditions of pressure and time in the hydrolysis treatments using the high hydrostatic pressure technology, according to the factorial design 2 <sup>2</sup> with 3 replicates of the central point.....	41
<b>Table 2</b> - Regression coefficients and ANOVA of fitted model for antioxidant capacities (ABTS, ORAC), soluble protein and aromatic amino acid assays.....	45

### CAPÍTULO III -APPLICATION OF PRELIMINARY HIGH-PRESSURE PROCESSING FOR IMPROVING BIOACTIVE CHARACTERISTICS AND REDUCING ANTIGENICITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES

<b>Table 1</b> – Detection of $\beta$ -Lg and $\beta$ -Lg-derived peptides (ppm and % values) using the RIDASCREEN® $\beta$ -Lactoglobulin kit in whey protein concentrate (WPC) and hydrolysates obtained by the use of FC and NPD without (WPH-n) and with HHP pre-treatments (PT) at different pressure and time levels .....	65
--	----

### APÊNDICE I

<b>Tabela 1</b> – Teor de proteínas solúveis e aminoácido aromáticos dos hidrolisados a partir da hidrólise do WPC nos diferentes tratamentos de hidrólise assistida por APH.....	74
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 ESTRUTURA DA TESE</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>5</b>
1.1 Soro de Leite	5
1.1.1 Proteínas do soro de leite	7
1.1.2 Alergenicidade das proteínas do soro de leite	10
1.2 Hidrólise Enzimática	11
1.3 Alta Pressão Hidrostática	11
1.3.1 Efeito da alta pressão hidrostáticas sobre as proteínas	12
1.3.2 Estratégias de uso da APH em conjunto com a hidrólise enzimática	14
1.4 Efeito da APH nas Propriedades dos Hidrolisados	17
1.4.1 Efeito da APH na hidrólise das proteínas	17
1.4.2 Efeito da APH na atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados	18
1.4.3 Efeito da APH na capacidade antioxidante dos hidrolisados	20
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>37</b>
<b>EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND PEPTIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEINS</b>	
<b>RESUMO</b>	<b>38</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>39</b>
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b>	<b>40</b>
2.1 Material	40
2.2 Preparation of Protein Hydrolysates	40
2.2.1 Preparation of whey	40
2.2.2 Hydrolysis processes	40
2.2.3 Experimental design	40
2.3 Chemical Characterization	41
2.3.1 Soluble protein content	41
2.3.2 Aromatic amino acid content	41
2.3.3 Chromatographic analysis of peptides and proteins	41
2.4 Antioxidant Capacity	42
2.4.1 ABTS Assay	42
2.4.2 ORAC Assay	42
2.5 Statistical Analysis	42

<b>3 RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>42</b>
3.1 Influence of HHP on the Chemical Properties of Hydrolyzed WPC	42
3.2 Influence of HHP on the Antioxidant Capacity of Hydrolyzed WPC	47
<b>4 CONCLUSION</b>	<b>49</b>
<b>5 REFERENCES</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>APPLICATION OF PRELIMINARY HIGH-PRESSURE PROCESSING FOR IMPROVING BIOACTIVE CHARACTERISTICS AND REDUCING ANTIGENICITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES</b>	<b>53</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>54</b>
<b>2 MATERIAL AND METHODS</b>	<b>55</b>
2.1. Materials	55
2.2. Hydrolysis process	56
2.3 HHP pre-treatment	56
2.4. Chemical characterization of hydrolysates	56
2.4.1 Soluble protein content	56
2.4.2 Aromatic amino acid content	56
2.4.3 Chromatographic analysis of proteins and peptides	56
2.5 Bioactive properties	57
2.5.1 In vitro Antioxidant Capacity	57
2.5.2 Vascular Relaxation	57
2.6. In vitro Allergenicity (ELISA)	57
2.7. Statistical analysis	58
<b>3 RESULT END DISCUSSION</b>	<b>58</b>
3.1 Conventional hydrolysis using NPD and FC	58
3.2 Hydrolysis with HHP pre-treatments	60
3.3 In vitro Antioxidant capacity	62
3.4 In vitro Allergenicity	64
3.5 In vitro vascular relaxation	66
<b>4. CONCLUSION</b>	<b>68</b>
<b>5 REFERENCES</b>	<b>68</b>
<b>3 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE I</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE II</b>	<b>76</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a relação entre dieta e saúde é muito discutida entre especialistas, e a importância de consumir alimentos que tenham na sua composição substâncias que auxiliam na promoção da saúde e diminuam o risco de doenças está bem difundida na sociedade. Desse modo, os alimentos, além de fornecerem nutrientes essenciais, podem ser consumidos com a finalidade de gerar impacto positivo na saúde. Essa relação, associada às mudanças no estilo de vida, aos avanços tecnológicos e à evolução socioeconômica, abrem um nicho de oportunidades para a indústria de alimentos, motivando o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com alegação funcional.

Os benefícios proporcionados pelos alimentos funcionais são provenientes de compostos bioativos como vitaminas, peptídeos, entre outros. Esses compostos bioativos podem ser encontrados naturalmente nos alimentos, formados durante o processamento ou extraídos de outras fontes, para serem adicionados em formulações. Em vista disso, as proteínas hidrolisadas, contendo elevada quantidade de peptídeos que apresentam bioatividade, são uma alternativa promissora para a indústria, que busca inovar, fornecer produtos funcionais e atender essa parcela crescente de mercado.

Os peptídeos bioativos são sequências de aminoácidos com efeitos fisiológicos demonstrados na saúde humana. Podem ser obtidos a partir da hidrólise de várias fontes de proteínas alimentares, permitindo o uso de coprodutos da agroindústria de alimentos que contenham alto teor de proteína, como o soro de leite que é obtido a partir da coagulação da caseína durante a produção de queijo. O alto teor de proteína, aproximadamente 20% do conteúdo total de proteínas do leite, resulta em um produto de alto valor nutricional, tecnológico e econômico. As proteínas mais abundantes no soro de leite são a  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina, porém a presença de proteínas como as imunoglobulinas, BSA e lactoferrina, também tornam o soro uma matéria-prima de grande interesse comercial.

As proteínas do soro de leite hidrolisadas são uma excelente alternativa de aproveitamento deste coproduto, pois apresentam propriedades nutricionais, funcionais e biológicas aprimoradas. A hidrólise pode liberar peptídeos bioativos que apresentam atividade anti-hipertensiva, atividade antimicrobiana, capacidade antioxidante, entre outras funcionalidades. Além disso, é muito eficiente em gerar produtos com alergenicidade reduzida, visto que as proteínas do soro são um dos principais responsáveis pela alta incidência de alergia alimentar, que frequentemente pode ser um fator limitante do uso destas proteínas.

A hidrólise pode ser realizada por diferentes métodos, porém o uso de enzimas como catalisadores da reação é uma opção mais vantajosa, especialmente para as indústrias que buscam produzir fórmulas hidrolisadas com hidrólise parcial ou extensiva das proteínas. Durante a hidrólise, os diferentes parâmetros de processamento, como temperatura, pH, tempo de hidrólise e, sobretudo, a especificidade das diferentes enzimas que podem ser utilizadas, são capazes de influenciar nas características finais dos hidrolisados.

A  $\beta$ -lactoglobulina, proteína predominante no soro de leite, possui uma conformação globular estável em pH ácido, o que muitas vezes pode dificultar a eficiência hidrolítica apenas pela ação enzimática. O uso da hidrólise combinada com o processamento de alta pressão hidrostática (APH), além de ser muito promissor em termos de melhora da eficiência hidrolítica, também pode influenciar no tempo de processamento e nas propriedades finais dos hidrolisados. A APH pode causar alterações na estrutura e/ou na conformação da proteína, facilitando o acesso das enzimas aos pontos específicos de clivagem, que antes estavam alocados no interior da molécula.

A APH é uma tecnologia não térmica, que consiste em submeter alimentos pré-embalados, sólidos ou líquidos, a pressões que podem chegar até 1000 MPa. O uso do processo de APH para melhorar o desempenho da hidrólise pode ser realizado através de duas maneiras: a) como pré-tratamento, que consiste em se submeter às proteínas a diferentes níveis de pressão por um tempo pré-determinado e em seguida realizar a hidrólise, ou b) como um tratamento simultâneo, no qual a enzima e a proteína são pressurizadas em conjunto e o processo de hidrólise é assistido pela pressão.

As proteínas do soro de leite apresentam grande relevância, o que fez o processo de hidrólise destas proteínas fosse muito estudado, principalmente por serem consideradas uma boa fonte de peptídeos bioativos. No entanto, a escolha de condições adequadas do processo, assim como da protease são fundamentais para obtenção de hidrolisados com melhores características. Diante do exposto, a Tese teve como objetivo aplicar o processo de alta pressão hidrostática na produção de hidrolisados a partir da proteína do soro de leite utilizando diferentes proteases. Os objetivos específicos foram: a) avaliar o uso das proteases pepsina, Novo Pro-D e ficina na hidrólise das proteínas do soro de leite; b) avaliar o uso da APH como um tratamento simultâneo à hidrólise ou como pré-tratamento e verificar o seu impacto nas características finais dos hidrolisados e c) realizar a caracterização química e biológica (capacidade antioxidante e atividade anti-hipertensiva), bem como a determinação da alergenicidade dos hidrolisados.

## 2 ESTRUTURA DA TESE

A presente tese foi estruturada em três capítulos, como segue:

O Capítulo I trata de uma revisão de literatura a respeito do soro de leite e suas principais proteínas. Além disso, foi realizada uma revisão acerca dos principais estudos científicos dos últimos 20 anos que avaliaram o impacto da APH na hidrólise de diferentes matrizes proteicas, bem como nas propriedades bioativas, tendo como enfoque a capacidade antioxidante e atividade anti-hipertensiva, além da redução da alergenicidade das proteínas hidrolisadas. Parte deste capítulo foi utilizado para redação de um artigo de revisão intitulado “Efeito da alta pressão hidrostática na obtenção de hidrolisados com propriedades biológicas melhoradas e alergenicidade reduzida: uma revisão” que será submetido à revista *Ciência Rural* (Apêndice II).

O capítulo II, intitulado “Efeito da alta pressão hidrostática na hidrólise péptica das proteínas do soro de leite e na capacidade antioxidante”, teve como objetivo avaliar a utilização do tratamento APH como PT ou HA e o seu efeito na hidrólise enzimática e nas propriedades antioxidantes do concentrado proteico de soro de leite (WPC), utilizando-se a enzima pepsina como biocatalisador. Este capítulo foi publicado na *Revista Ciência Rural* (2021) (LANDIM, A. P. M. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant capacity and peptic hydrolysis of whey proteins. *Ciência Rural*, v. 51, 2021).

O capítulo III, intitulado “Aplicação de processamento preliminar de alta pressão para melhorar as características bioativas e reduzir a antigenicidade dos hidrolisados de proteína de soro de leite” teve como objetivo avaliar a utilização das proteases Novo Pro-D® e ficina na hidrólise de proteínas do soro de leite pré-tratadas ou sem tratamento por HHP, e verificar as características químicas, propriedades bioativas como capacidade antioxidante *in vitro* e relaxamento vascular *ex vivo* e alergenicidade *in vitro* dos hidrolisados. Este capítulo está em tramitação para publicação na revista *Food Science and Technology International*.

# **CAPÍTULO I**

## **REVISÃO DE LITERATURA**

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Soro de Leite

O soro é um coproduto da indústria de laticínios, obtido a partir da coagulação da caseína do leite durante a produção de queijo. Normalmente, a produção de 1 kg de queijo gera, em média, 9 litros de soro, apresentando grande relevância para indústria, tanto pelo elevado volume produzido, quanto pela sua composição nutricional, que compreende mais da metade dos sólidos presentes no leite, incluindo grande parte da lactose, proteínas do soro, sais minerais e vitaminas solúveis (ATRA *et al.*, 2005; BALDASSO *et al.*, 2011).

Assim, o gerenciamento deste resíduo pode se tornar um problema complexo para a indústria de laticínio, sobretudo com aumento do consumo de produtos lácteos e consequente aumento da produção de soro de leite. É um resíduo de alta carga orgânica e, por isto, altos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), caracterizando-o com elevado poder poluente. Dessa forma, as regulamentações ambientais nacionais são rigorosas e proíbem o descarte de soro de leite como efluente, sem prévio tratamento (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; YADAV *et al.*, 2015).

O soro contém cerca de 55% dos nutrientes do leite e representa aproximadamente 85 a 95% do volume total do leite. A composição média depende da composição química do leite, que varia conforme a alimentação, reprodução e diferença individual de cada animal, além das influências edafoclimáticas. Além disso, o processo de obtenção do soro também tem influência na sua composição final. O produto obtido pela coagulação da caseína em torno do pH 6,5 pode ser classificado como doce e, quando obtido pela coagulação da caseína em pH inferior a 5, pode ser classificado como soro ácido. As principais diferenças que podem ser destacadas entre as duas categorias de soro são: o conteúdo mineral, a acidez e o conteúdo de proteínas do soro de leite, como pode ser observado na Tabela 1 (CASTRO *et al.*, 2017; YADAV *et al.*, 2015).

**Tabela 1** – Características composicionais do soro de leite doce e soro de leite ácido

Constituintes	Soro Doce (g/L)	Soro ácido (g/L)
Sólidos Totais	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactose	45,0-52,0	44,0-46,0
Proteína	6,0-10,0	6,0-8,0
Gordura	0,5	0,4
Lactato	2,0	6,4
Cinza	5,0	8,0
Cálcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1,0-3,0	2,0-4,5
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: Yadav et al., 2015

O soro de leite pode ser usado na forma líquida, no seu estado *in natura*, especialmente para a alimentação animal, ou ainda, ser usado na formulação de derivados lácteos, como as bebidas lácteas (ALVES *et al.*, 2014). Contudo, a principal razão que motiva o

beneficiamento do soro de leite é o seu conteúdo proteico (CASTRO *et al.*, 2017). Visto que o soro de leite contém cerca de 95% de água, etapas de concentração e secagem são fundamentais para agregação de valor do resíduo bruto, gerando uma ampla categoria de ingredientes e produtos proteicos, conhecidos como *whey proteins*. O soro de leite em pó, concentrados e isolados proteicos são os principais ingredientes proteicos na cadeia de aproveitamento, porém, a obtenção de ingredientes não-proteicos, como a lactose também são desenvolvidos e comercializados no Brasil e no mundo (YADAV *et al.*, 2015). Ainda, outra forma de beneficiamento do soro se dá por meio de processos biotecnológicos, como a hidrólise enzimática e fermentação, gerando ingredientes e produtos que podem ser fonte de diversos peptídeos bioativos (Figura 1) (UDENIGWE; ALUKO, 2012; YADAV *et al.*, 2015).



**Figura 1** – Exemplos de produtos proteicos produzidos a partir do soro de leite comercialmente disponível no Brasil.

O soro em pó é um produto seco que contém os mesmos componentes do soro de leite, pois não é fracionado utilizando-se a filtração por membrana, e geralmente contém 70% de lactose, 1,5% de gordura, 12% de proteína, 4% de umidade e 8,5% de outros sólidos. Por outro lado, o concentrado proteico de soro de leite (WPC – *Whey Protein Concentrate*) e o isolado proteico de soro de leite (WPI – *Whey Protein Isolate*) são obtidos removendo-se os componentes não proteicos, usando a tecnologia de ultrafiltração para alcançar determinadas percentagens de proteína (CARTER; DRAKE, 2018). A principal diferença entre o WPC e o WPI está no processamento e na concentração final de proteínas. O WPC varia de 34 a 89% de proteína, enquanto o WPI possui concentração superior a 90% de proteína (JERVIS *et al.*, 2012; SMITH; FOEGEDING; DRAKE, 2015).

Outra opção que vem sendo amplamente estudada é a produção de hidrolisado proteico de soro de leite (WPH – *Whey Protein Hydrolysate*). Em geral, o método mais comum de obtenção de hidrolisados são por processos enzimáticos, visando converter a  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e demais proteínas do soro em peptídeos, ou seja, fragmentos de proteínas. O soro de leite hidrolisado é amplamente utilizado como ingredientes em fórmulas infantis, tanto no Brasil como no exterior. As vantagens dessas fórmulas contendo proteínas hidrolisadas são observadas pela melhora da digestibilidade das proteínas e pela redução da alergenicidade (MADUREIRA *et al.*, 2010; YALÇIN, 2006; MEISEL, 1998).

Além disso, a hidrólise das proteínas lácteas vem sendo estudada em todo o mundo nas últimas décadas, com o objetivo de obtenção de peptídeos bioativos, sendo responsáveis por exercer atividades biológicas específicas que podem trazer benefícios à saúde. Países da União Europeia da Ásia comercializam alimentos lácteos contendo peptídeos bioativos como apresentado na Tabela 2 (KORHONEN, 2009; ZHAO; ASHAOLU, 2020).

**Tabela 2** - Produtos lácteos e ingredientes comerciais com apelo funcional baseado em peptídeos bioativos

Proteína	Sequência	Nome comercial	Tipo	Alegação	Fabricante
Proteínas do leite	Dipeptídeos e tripeptídeos	PeptoPro®	Ingrediente	Aumenta a síntese de proteína muscular	DSM, Holanda
$\alpha$ 1-Caseína	YLGYLEQLL R	Prodiet F200 Lactium	confeitaria e bebida	Alivia o estresse	Ingredia, França
$\alpha$ 1, $\beta$ -Caseína	IPP e VPP	Calpis	Leite fermentado	Hipotensivo	Calpis Co. Japão
$\beta$ e $\kappa$ -Caseína	IPP and VPP	Calpico/ Calpis AMEAL	Leite fermentado	Hipotensivo	Calpis Co., Japão
Peptídeo derivado de caseína	FFVAPFPE VFGK	C12 peptide	Ingrediente peptídico	Hipotensivo	DMV, Holanda
$\alpha$ -Lactalbumina	fragmentos de $\alpha$ -LA	Lacprodan® ALPHA-10	Alimento saudável	Melhora o sono e a memória	Arla foods, Dinamarca
		Peptigen® IF-3087/3090/3012/3080	Alimento infantil	Ligação de minerais	Arla foods, Dinamarca
Whey protein	WPH	Lacprodan®DI -3071/3021 Lacprodan® HYDRO.milk	Nutrição esportiva	Absorção de vitaminas e minerais; melhoria da higiene oral	Arla foods, Denmark
Whey protein	GMP (106–109)	BiPRO WPI	Ingrediente e fórmula infantil	Antitrombótico, anticariogênico Antimicrobiano	Davisco foods, Minnesota
Whey protein hidrolisado	Fragmentos de $\beta$ -LG	Biozate 3 and 7	Ingrediente	Hipotensivo	Davisco foods, Minnesota

Fonte: adaptado de ANUSHA & BINDHU (2016).

### 1.1.1 Proteínas do soro de leite

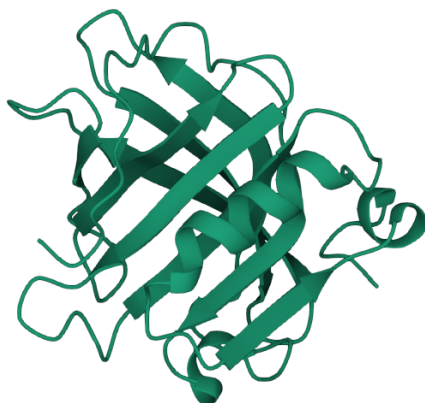
As proteínas concentradas e isoladas do soro do leite estão se tornando ingredientes alimentares funcionais cada vez mais populares (ALVES *et al.*, 2014). Possuem alta qualidade nutricional em relação a outras proteínas alimentares, são ricas em aminoácidos essenciais, como leucina, valina, isoleucina e cisteína, importantes agentes no metabolismo, função neural e homeostase (DULLIUS *et al.*, 2018; PATEL, 2015).

Além disso, as proteínas de soro de leite compõem ingredientes versáteis no desenvolvimento de muitos produtos alimentícios. Apresentam propriedades tecnológicas importantes e podem funcionar como modificador de textura, agente espessante, carreador/veículo, agente gelificante, componente tensoativo e agente espumante, entre outras funcionalidades (CASTRO *et al.*, 2017).

Em relação à composição proteica, o soro de leite é constituído, principalmente, pela  $\beta$ -lactoglobulina (55-60%) e  $\alpha$ -lactalbumina (15-20%) e, em menores proporções, também estão presentes as imunoglobulinas (Igs), albuminas do soro bovino (BSA), lactoferrina (Lf), lactoperoxidasas (Lp) e glicomacropéptidos (GMP) (YADAV *et al.*, 2015).

**$\beta$ -lactoglobulina:** A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), em termos quantitativos, é a proteína mais importante do soro de leite. Equivale a 10% das proteínas presentes no leite e em torno de 50 a 60% do total de proteínas do soro. É uma proteína globular que está presente na maioria das espécies mamíferas, porém está ausente no leite humano (YADAV *et al.*, 2015).

Existem 10 variantes genéticas conhecidas de  $\beta$ -Lg e as mais abundantes são as  $\beta$ -Lg A e  $\beta$ -Lg B. Ambas são compostas por 162 aminoácidos, com massa molecular de 18,3 kDa. A principal diferença entre elas são as substituições dos aminoácidos na posição 64 e 118, onde a variante A tem um resíduo de ácido aspártico e um resíduo de valina, enquanto a variante B tem os resíduos de aminoácidos glicina e alanina, respectivamente (KILARA; VAGHELA, 2018; MAUX *et al.*, 2014). A proteína apresenta uma estrutura tridimensional composta por uma hélice- $\alpha$ , duas folhas- $\beta$  antiparalelas e seis folhas- $\beta$  paralelas que, juntas, constituem um barril- $\beta$ . Estas estruturas secundárias são estabilizadas por duas pontes dissulfeto deixando um resíduo de cisteína permanentemente livre que contribui para estabilidade da proteína nativa (KILARA; VAGHELA, 2018). A estrutura terciária da  $\beta$ -Lg encontra-se ilustrada na Figura 2.



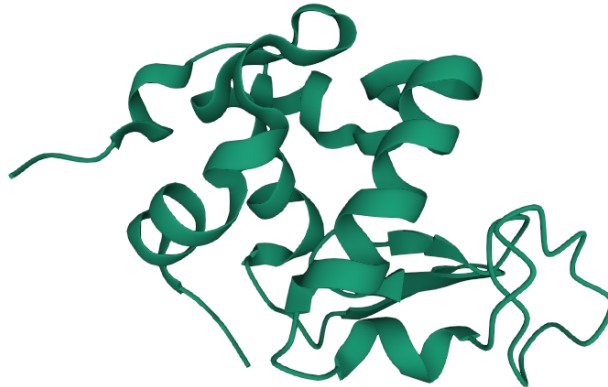
**Figura 2** - Estrutura tridimensional da  $\beta$ -Lg bovina (Fonte: RSCB Protein Data Bank, 2020)

Conforme o pH, a temperatura e a força iônica do meio, a estrutura quaternária desta proteína pode variar entre monômero, dímero ou octâmero. A forma prevalente em condições fisiológicas (pH 5,2 até 7,9) da  $\beta$ -lg é como dímero, e quando o pH está abaixo de 3,0 ou acima de 8,0, apresenta-se como monômero. Quando o pH do meio situa-se entre 3,1 e 5,1, as estruturas da  $\beta$ -Lg tendem a se associar e formar octâmero (EDWARDS; JAMESON, 2014). A  $\beta$ -Lg é uma proteína bastante sensível ao pH e à temperatura e pode ser precipitada sob aquecimento. À temperatura de 70 °C, os grupos sulfidril livres da  $\beta$ -lactoglobulina são expostos, possibilitando a formação de novas ligações dissulfeto entre as moléculas, fazendo com que a proteína se desnature em torno dessa temperatura. No entanto, o processo de desnaturação da  $\beta$ -Lg é complexo e influenciado por diferentes fatores como o pH, a concentração de proteína, o ambiente iônico e a variante genética (EDWARDS; JAMESON, 2014).

**$\alpha$ -lactalbumina:** A  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) é o segundo maior componente das proteínas do soro e compreende cerca de 2% da proteína total do leite e 13% da proteína total do soro. A



$\alpha$ -La é uma pequena e compacta proteína globular, estabilizada por quatro pontes dissulfeto, sem a presença de grupo tiol livre (SCHOKKER *et al.*, 2000). A massa molecular da  $\alpha$ -La é 14 kDa, composta por 123 aminoácidos e contendo oito resíduos de cisteína (YADAV *et al.*, 2015). Em geral,  $\alpha$ -La pode sofrer desdobraimento térmico a uma temperatura mais baixa do que a  $\beta$ -Lg (EDWARDS; JAMESON, 2014). No entanto, ao contrário de outras proteínas, a  $\alpha$ -La na presença de cálcio se torna mais estável ao calor, pois aproveita o cálcio para formar ligações iônicas intramoleculares, tornando a molécula resistente à desnaturação térmica (KILARA; VAGHELA, 2018). A estrutura terciária da  $\alpha$ -La encontra-se ilustrada na Figura 3.



**Figura 3** - Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -La bovina (Fonte: RSCB Protein Data Bank, 2020).

**Albumina do soro bovino:** A albumina sérica bovina (BSA) corresponde a 5-6% do total de proteínas do soro de leite, muito semelhante à concentração no leite humano. A BSA é muito heterogênea e sua concentração no leite é muito semelhante à presente no sangue bovino. A BSA é uma proteína globular que desempenha um papel fundamental na manutenção da pressão plasmática e do equilíbrio nutricional com bom perfil de aminoácidos essenciais (JAHANBAN-ESFAHLAN *et al.*, 2019). Apresenta massa molecular de 66,26 kDa, contendo uma cadeia simples com 582 aminoácidos, 17 ligações dissulfídicas intramoleculares e um grupo tiol livre (WALSTRA *et al.*, 2010). O BSA tem temperatura de desnaturação de 64 °C, próxima à do  $\alpha$ -LA (62 °C), porém a ligação com ácidos graxos estabiliza a molécula contra a desnaturação (ANTUNES, 2003).

**Imunoglobulinas:** As imunoglobulinas (IG) constituem pelo menos 2% da proteína total do leite, são uma família de proteínas globulares das quais três classes estão presentes no soro bovino: IgA, IgM, IgG. Além disso, a IgG tem duas subclasses, IgG1 e IgG2. Todas essas moléculas apresentam uma estrutura básica semelhante, consistindo em monômeros ou polímeros de uma molécula com quatro cadeias, duas cadeias polipeptídicas leves (massa molecular ~ 25kDa) e duas cadeias pesadas (massa molecular 50 – 70 kDa). Estas proteínas exibem temperatura de desnaturação mais elevada, porém na presença das demais proteínas do soro são extremamente termossensíveis (GAPPER *et al.*, 2007).

**Lactoferrina:** A Lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína, globular, composta por uma única cadeia de ~689 aminoácidos e massa molecular de 80 kDa. É membro da família da transferrina e está presente no leite e na maioria dos fluidos biológicos de mamíferos. A Lf faz ligações com  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , mas também pode se ligar a outros íons metálicos como o  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$ . Possui propriedades que auxiliam no combate ao câncer, tem atividade anti-inflamatória e é moduladora do sistema imunológico. No entanto, as características mais

estudadas e conhecidas são a atividade antimicrobiana e antifúngica, a qual pode atuar contra uma ampla variedade de bactérias e leveduras (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2011).

**Lactoperoxidase:** A lactoperoxidase (LP) é uma enzima oxidoreductase secretada em todos os leites de mamíferos. Atua no sistema de defesa, protegendo a glândula mamária lactante e o trato intestinal de recém-nascidos contra microrganismos patogênicos. Consiste em uma única cadeia polipeptídica contendo 612 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 78 kDa. Contém 15 resíduos de cisteína, um grupo heme e cerca de 10% de frações de carboidratos. A LP é uma proteína básica, com ponto isoelétrico de 9,6. A desnaturação depende do binômio tempo e temperatura, mas a partir de 70 °C é possível observar alguma desnaturação. No leite bovino, a LP é a enzima que está em maior quantidade, compreendendo cerca de 30 mg/L, e constituindo cerca de 0,5% das proteínas de soro de leite (KUSSENDRAGER; HOOIJDONK; VAN, 2000).

**Glicomacropéptido:** O GMP é produzido hidrolisando-se a ligação peptídica dos aminoácidos fenilalanina-105 e metionina-106 da  $\kappa$ -caseína, por meio da ação enzimática durante a coagulação do leite na fabricação do queijo. O GMP é formado por 64 aminoácidos hidrofílicos da porção C-terminal da  $\kappa$ -caseína. Apresenta massa molecular de 6,8 kDa, ponto isoelétrico em pH 4,3 a 4,6 e apresenta grande termoestabilidade. Pode ser usado como suplemento nutricional, aditivo alimentar ou como alimento funcional. Além disso, recentemente outros estudos investigaram as atividades biológicas do GMP e verificaram que apresenta impacto na saúde humana por exercer diferentes bioatividades, como antibacteriana, prebiótica, remineralizante, moduladora do processo de digestão e metabolismo, antitumoral e imunomoduladora (CÓRDOVA-DÁVALOS; JIMÉNEZ; SALINAS, 2019).

### 1.1.2 Alergenicidade das proteínas do soro de leite

São evidentes os diversos efeitos positivos das proteínas do soro de leite, tanto em relação ao uso como ingrediente em alimentos, quanto como suplemento alimentar. No entanto, a capacidade de causar reações adversas em indivíduos suscetíveis da população, como os alérgicos às proteínas do leite, pode ser um fator limitante para o uso destas proteínas. A alergia alimentar representa um importante problema de saúde pública e corresponde a um distúrbio do sistema imunológico, em resposta à proteína alimentar. A alergia ao leite é uma das principais alergias alimentares e afeta principalmente crianças, podendo persistir até a idade adulta em 15% dos casos (EL-AGAMY, 2007; SOLÉ *et al.*, 2018).

O leite de vaca contém cerca de 30 proteínas potencialmente alergênicas. Dentre os componentes do soro de leite, os principais alergênicos são as proteínas globulares  $\beta$ -Lg (Bos d 5) e  $\alpha$ -La (Bos d 4), constituindo 50% e 25% da fração proteica do soro de leite, respectivamente, seguidos de constituintes menores, como BSA (Bos d 6), Ig (Bos d 7) e LF (VILLA *et al.*, 2018). A  $\beta$ -Lg é considerada o principal alérgeno, pois é responsável por cerca de 66% das alergias ao leite, seguido da  $\alpha$ -lactalbumina e BSA, responsáveis por aproximadamente 18% (MICINSKIA *et al.*, 2013). O alto potencial alergênico da  $\beta$ -Lg tem relação com a resistência relativa à hidrólise ácida, bem como às atividades de proteases, permitindo preservar alguma integridade estrutural após a digestão, seguida da absorção pela mucosa intestinal e posterior apresentação às células imunocompetentes, com alto potencial alergênico (MICINSKIA *et al.*, 2013; VILLA *et al.*, 2018).

Em geral, a prevenção da alergia alimentar é realizada por meio da exclusão do alérgeno da alimentação. No entanto, muitos estudos vêm sendo realizados e algumas tecnologias podem ser utilizadas com o intuito de reduzir efetivamente a alergenidade das proteínas do soro de leite, como tratamento térmico, alta pressão hidrostática, hidrólise

enzimática, fermentação, ultrassom, dentre outras. Além disso, a combinação de tecnologias pode ser crucial para reduzir a alergia ao leite de vaca (BU *et al.*, 2013; VILLA *et al.*, 2018).

## 1.2 Hidrólise Enzimática

As proteínas do soro de leite são amplamente estudadas e já são bem conhecidos os benefícios do consumo destas proteínas hidrolisadas em relação às proteínas nativas, dado que os hidrolisados pode apresentar características melhoradas em relação à digestibilidade e menor alergenicidade. Além disso, já está bem elucidado que as proteínas do soro de leite podem ser consideradas uma boa fonte de peptídeos que possuem várias bioatividades, como atividade anti-hipertensiva, capacidade antioxidante, antimicrobiana, dentre outros (ZHAO e ASHAOLU, 2020; UDENIGWE; ALUKO, 2012).

Muitos estudos têm como principal objetivo otimizar a proteólise considerando apenas o grau de hidrólise, ou seja, o número de ligações peptídicas que são clivadas nas proteínas. No entanto, as características bioativas ganharam maior relevância na última década e os estudos de otimização do processo estão voltados para a escolha de condições que favoreçam também a produção de hidrolisados que apresentem maior valor agregado, em termos de quantidade e bioatividade dos peptídeos (CHEISON; KULOZIK, 2017; MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018).

A hidrólise proteica pode ser realizada por processo químico ou enzimático. Todavia a aplicação de proteases para produção de hidrolisados tem sido predominante, já que permite maior controle e reprodutibilidade do processo (MAZORRA-MANZANO; RAMÍREZ-SUAREZ; YADA, 2018; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2018). Normalmente, a maneira mais simples de conduzir a proteólise consiste na utilização de diferentes enzimas como catalisadores da reação de quebra da proteína em frações menores, produzindo uma mistura de peptídeos de diferentes tamanhos moleculares e aminoácidos livres (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2017; CLEMENTE, 2000).

Durante a hidrólise enzimática, vários fatores podem influenciar o processo, sobretudo na obtenção dos peptídeos com características funcionais, como tipo e especificidade da enzima escolhida, pH, temperatura, grau de hidrólise, entre outros (CHEISON; KULOZIK, 2017; TAVARES *et al.*, 2011). Existe uma grande variedade de enzimas comerciais com características diferentes de especificidade que podem ser utilizadas para o processo, porém obter uma hidrólise eficiente das proteínas ainda é um desafio, principalmente pela estrutura compacta do estado nativo das proteínas (ABADÍA-GARCÍA *et al.* 2016; TAVARES *et al.* 2012). Para alcançar uma hidrólise mais extensa, as enzimas necessitam, principalmente, ter acesso às ligações peptídicas do enovelado proteico, portanto as interações que estabilizam a estrutura da proteína limitam e controlam o tempo de processamento e a composição da mistura de peptídeos produzida (AMBROSI *et al.*, 2016). Desse modo, considerando a estrutura compacta das principais proteínas do soro, algumas estratégias podem ser exploradas para aumentar a eficiência do processo, como o uso de tecnologias, como a APH, que atuam modificando as proteínas e/ou aumentando a sensibilidade da enzima ao substrato (TAVARES *et al.*, 2012; MARCINIAK *et al.*, 2018).

## 1.3 Alta Pressão Hidrostática

A APH é uma tecnologia que já está presente em diversas unidades industriais em diferentes países, o que a torna, dentre as tecnologias emergentes não térmicas, possivelmente a mais bem sucedida. Essa tecnologia consiste em submeter alimentos sólidos ou líquidos, pré-embalados, a pressões que podem chegar até 800 MPa. Embora com o aumento da pressão ocorra certa elevação da temperatura, ainda sim, é considerada uma tecnologia não térmica, pois o aumento a cada 100 MPa eleva a temperatura do sistema apenas em 3 °C o

que, em geral, não supera 40 °C nos processamentos realizados em alimentos, sem a necessidade de resfriamento posterior. Além disso, a baixa demanda energética para manter o alimento sob pressurização, e a possibilidade de recirculação do líquido de pressurização, torna o processo ecologicamente sustentável (POTTIER; VILLAMONTE; LAMBALLERIE, 2017; RASTOGI *et al.*, 2007; YAMAMOTO, 2017).

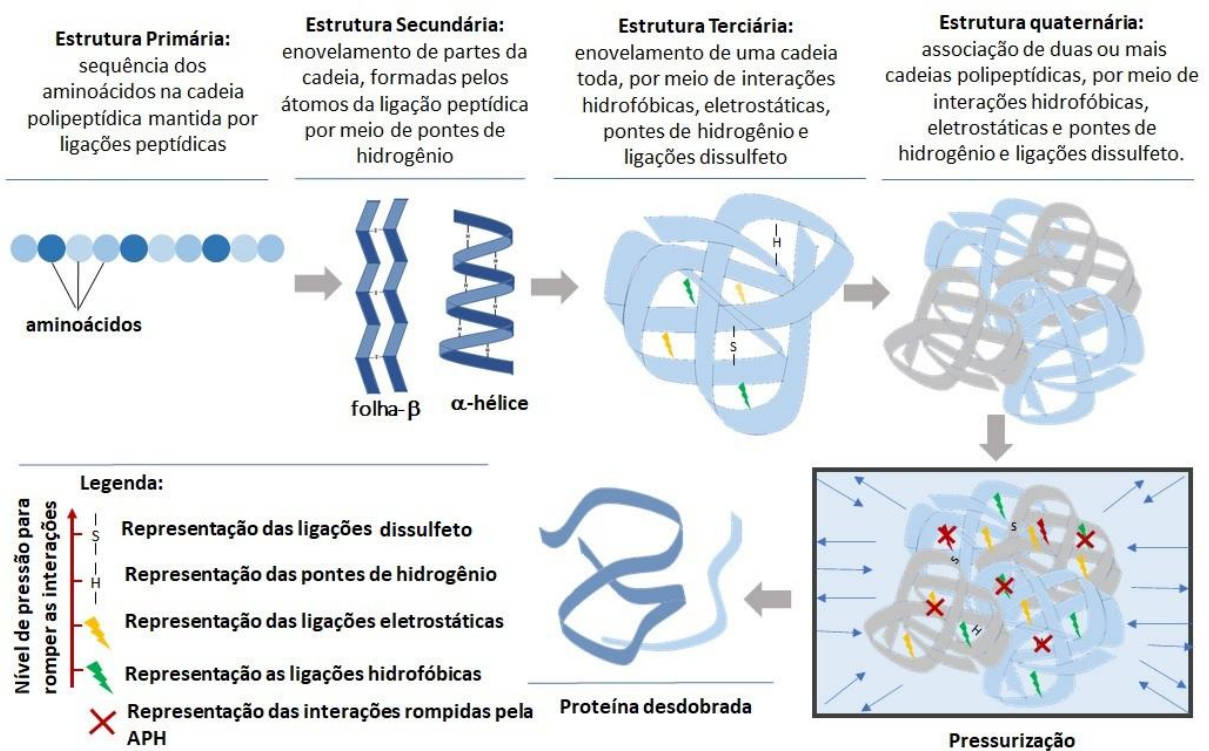
A APH tem apresentado vasta aplicação e potencial de expansão para o processamento de alimentos devido à sua versatilidade quanto à aplicação em diferentes alimentos com variados objetivos (HUANG; HSU; WANG, 2020; POTTIER; VILLAMONTE; LAMBALLERIE, 2017). Essa tecnologia baseia-se em dois princípios básicos: o princípio de “Lê Chatelier”, que concebe que qualquer fenômeno na reação química de equilíbrio, transição de fase e/ou mudança na configuração molecular é acompanhado por diminuição do volume, que pode ser potencializado pela pressão; e o princípio isostático, que preconiza que a pressão é transmitida ao alimento instantaneamente e uniformemente, independente da forma, tamanho e composição, quando o produto se encontra em contato direto com o meio pressurizado ou em recipiente capaz de transmitir a pressão (MORAIS; FERREIRA; ROSENTHAL, 2014; ZHANG *et al.* 2019; CHAWLA; PATIL; SINGH, 2011). Em função disso, a tecnologia de APH é promissora do ponto de vista tecnológico, pois os efeitos APH não são influenciados pelo formato e tamanho das embalagens de alimentos, e produtos alimentícios de diferentes volumes podem ser processados no mesmo lote, diferentemente dos métodos térmicos tradicionais.

A APH foi extensivamente estudada com intuito de substituir as tecnologias convencionais de conservação, já que pode eliminar microrganismos sem o emprego de elevadas temperaturas, se tornando muito atrativa para garantir a segurança microbiológica e preservar a qualidade final do produto, em termos nutricionais e sensoriais. No entanto, o alto custo do equipamento de alta pressão é um fator limitante na sua implementação na indústria frente aos processos convencionais de conservação (POTTIER; VILLAMONTE; LAMBALLERIE, 2017), sobretudo por tratar-se de um processo em batelada. Desse modo, o uso da APH tem sido associada à produção de alimentos com alegações funcionais e que apresentam como diferencial baixa quantidade de aditivos na sua formulação, além de preservação das características nutricionais e sensoriais próximas às dos alimentos não processados (HUANG; HSU; WANG, 2020; POTTIER; VILLAMONTE; LAMBALLERIE, 2017; YAMAMOTO, 2017). Além disso, a APH tem mostrado potencial para diversas aplicações no processamento de alimentos, como redução de sódio (RODRIGUES *et al.*, 2016), melhoria das características de textura de carnes bovinas (NETO *et al.*, 2015), na sacarificação do mosto no processamento de cerveja (SANTOS *et al.*, 2017), extração de compostos funcionais (HUANG; HSU; WANG, 2020), etc. No seguimento de proteínas alimentares, a APH pode ser usada em conjunto com o processo de hidrólise, apresentando algumas vantagens como aumento do rendimento, redução do tempo de processamento e do custo de produção, melhora das características bioativas dos hidrolisados, além de redução mais eficiente da antigenicidade das proteínas (ABADÍA-GARCÍA *et al.*, 2016; MARCINIAK *et al.*, 2018; YADAV *et al.*, 2016)

### **1.3.1 Efeito da alta pressão hidrostáticas sobre as proteínas**

Para entender os efeitos da APH, é preciso destacar que as proteínas, em geral, são macromoléculas que apresentam uma organização estrutural que pode ser dividida ao nível primário, secundário, terciário e quaternário como ilustrado na Figura 4. A estrutura primária consiste em uma sequência de diferentes aminoácidos, ligados por ligações covalentes. A estrutura secundária refere-se à estrutura primária dobrada sobre si mesma que se forma em um polipeptídeo decorrente de interações por pontes de hidrogênio entre os aminoácidos componentes da cadeia, sendo os tipos mais comuns a  $\alpha$ -hélice e a folha- $\beta$  pregueada. Já a

estrutura terciária, é a estrutura tridimensional geral de um polipeptídeo, compreendendo outras interações entre os grupamentos dos aminoácidos, como ligações eletrostáticas, hidrofóbicas de Van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações dissulfídicas. E por fim, a estrutura quaternária é a interligação das subunidades, constituídas duas ou mais cadeias polipeptídicas, unidas pelas mesmas forças intermoleculares descritas anteriormente. O equilíbrio destas estruturas é mantido pelas interações estabilizadoras na cadeia proteica, e qualquer mudança que possa perturbar o equilíbrio destas interações, intra e intermoleculares, pode levar à desnaturação da proteína (HENDRICKX *et al.*, 1998; LULLIEN-PELLERIN; BALNY, 2002). Desse modo, qualquer alteração reversível ou irreversível da conformação nativa das proteínas, sem haver perda das ligações covalentes, pode ser compreendida como desnaturação (HINRICHS; RADEMACHER, 2004).



**Figura 4** - Representação dos diferentes níveis estruturais das proteínas e efeito da alta pressão hidrostática na estrutura e conformação das proteínas.

A APH tem ação sobre as principais interações proteicas, podendo promover diferentes níveis de desnaturação da proteína (figura 4). As estruturas quaternárias e terciárias são as mais afetadas pelo uso da pressão, pois são mantidas, principalmente, por interações hidrofóbicas e eletrostáticas que são mais sensíveis à pressão (LULLIEN-PELLERIN; BALNY, 2002; MENG *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2012). Já a estrutura secundária, requer o uso de pressões mais elevadas para que as alterações sejam efetivas. E, por fim, a estrutura primária não sofre efeito da APH, pois é formada por ligações covalentes (GOYAL *et al.*, 2013; MOZHAEV *et al.*, 1994; YANG; POWERS, 2016).

Para a hidrólise enzimática, o desdobramento da proteína causado pela APH é a alteração mais importante, sendo um parâmetro chave para melhora do processo, pois permite maior acesso da enzima a mais pontos de clivagem específicos, que antes estavam protegidos no interior da molécula. No entanto, os parâmetros utilizados durante a pressurização, bem como as características bioquímicas das proteínas, são fatores que orientam a intensidade da

desnaturação, a taxa de redobramento após a despressurização e o tempo para recuperação do estado inicial da proteína (CARULLO; BARBOSA-CÁNOVAS; FERRARI, 2020).

As diversas proteínas podem apresentar diferentes sensibilidades quanto à pressão. Essa diferença ocorre devido ao tipo e a quantidade de interações que governam a estrutura proteica. Como exemplo, as proteínas do soro de leite, em que a  $\beta$ -Lg possui apenas duas ligações dissulfeto e um grupo -SH livre, enquanto a  $\alpha$ -La tem uma estrutura mais rígida com quatro ligações dissulfeto, e a albumina sérica bovina (BSA) apresenta 17 pontes dissulfeto e um grupo tiol livre (GOYAL *et al.*, 2013; HUPPERTZ; FOX; KELLY, 2004; LOPEZ-FANDIÑO; CARRASCOSA; OLANO, 1996). À vista disto, a  $\beta$ -lactoglobulina apresenta desdobramento irreversível quando submetida a pressões de 400 MPa, enquanto para a  $\alpha$ -lactoalbumina, são necessárias pressões superiores a 500 MPa, para que alterações semelhantes sejam notadas (AMBROSI *et al.*, 2016; HUPPERTZ *et al.*, 2006). Já a BSA, mesmo em pressões superiores a 500 MPa, pouco desdobramento é observado (LOPEZ-FANDIÑO; CARRASCOSA; OLANO, 1996).

Além disso, a formação de agregados moleculares é outra alteração importante que pode ser induzida pela APH e, contrariamente ao desdobramento, pode diminuir o rendimento da hidrólise enzimática. O rompimento das ligações hidrofóbicas do núcleo das proteínas, como reflexo do desdobramento, causa a exposição de grupos hidrofóbicos e sulfidrilas (-SH), que podem ficar livres para interagir e formar novas interações hidrofóbicas e ligações dissulfetos entre as proteínas (GARCIA-MORA *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2008). As interações proteína-proteína, em geral, são observadas quando são utilizadas pressões mais elevadas e pode reduzir a quantidade de sítios disponíveis para interação enzima-proteína e, como consequência, pode diminuir o rendimento do processo de hidrólise (AL-RUWAIH *et al.*, 2019; BOUKIL *et al.*, 2018; GIRGIH *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017).

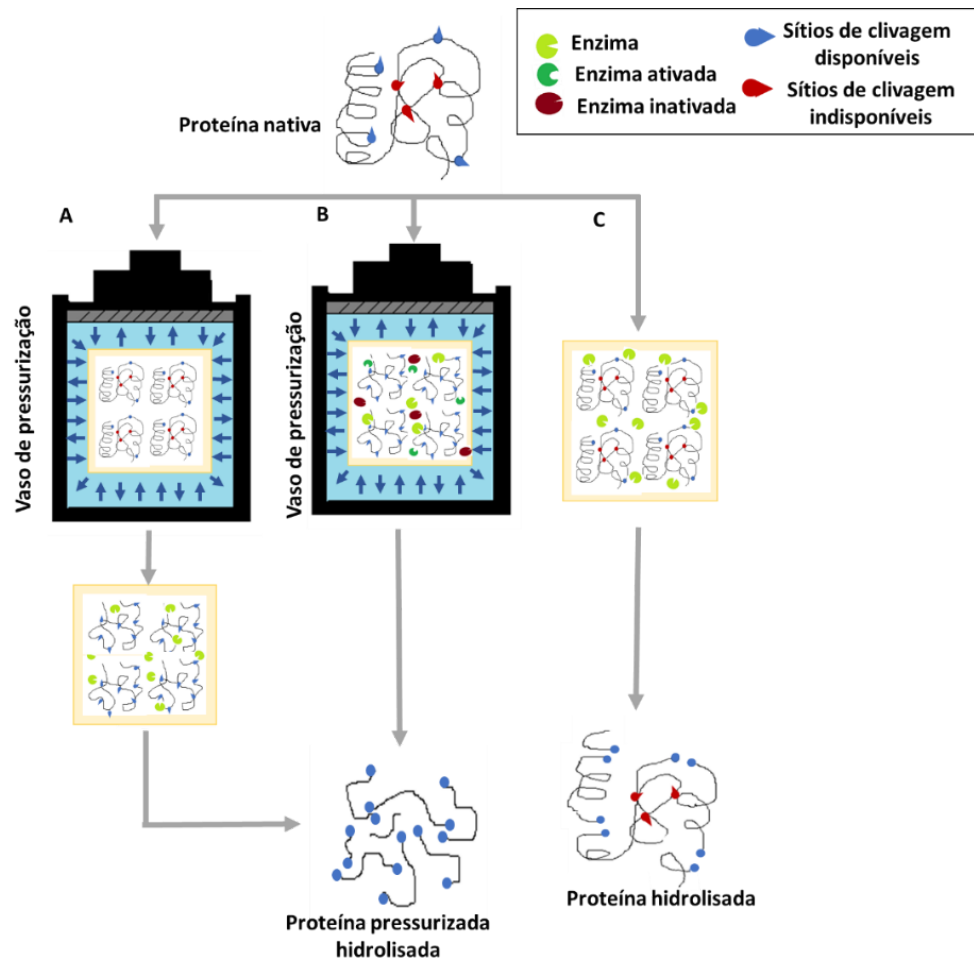
### 1.3.2 Estratégias de uso da APH em conjunto com a hidrólise enzimática

Como discutido no tópico anterior, a pressurização causa o desdobramento das proteínas e essa alteração estrutural é a mais importante para processos hidrolíticos, pois melhora a susceptibilidade à hidrólise enzimática, expondo os sítios de ligação das enzimas. Para que se obtenha a desnaturação da proteína e, como consequência, um processo de hidrólise mais eficiente, a APH pode ser utilizada de duas formas diferentes: como um tratamento prévio da proteína ou na hidrólise assistida por APH, conforme a representação nas Figuras 4A e 4B, respectivamente.

O uso da APH como pré-tratamento, consiste em submeter a proteína em níveis elevados de pressão por um tempo determinado e, em seguida, realizar o processo de hidrólise à pressão ambiente (0,1 MPa). Diversos estudos demonstraram que esta pode ser uma boa estratégia para aumentar a eficiência do processo de hidrólise das proteínas do soro de leite (LANDIM *et al.*, 2021; BOUKIL *et al.*, 2018; PEÑAS *et al.*, 2006b), bem como em outras matrizes proteicas como farinha de grilo e larvas (DION-POULIN *et al.*, 2020), feijão (AL-RUWAIH *et al.*, 2019), cogumelo (ZHAO *et al.*, 2017) e linhaça (PERREAULT *et al.*, 2017).

No entanto, após a despressurização do sistema, pode ocorrer a reorganização estrutural da proteína, tendo como consequência perda contínua da susceptibilidade à hidrólise, em função do redobramento proteico (CHICÓN *et al.*, 2009). Belloque *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de redobramento das proteínas do soro de leite e observaram uma taxa de redobramento mais rápida nas proteínas tratadas a 200 MPa em relação àquelas tratadas a 400 MPa sugerindo que, em pressões superiores, as alterações permanecem por mais tempo, em alinhamento com resultados encontrados por Carullo, Barbosa-Cánovas e Ferrari (2020). Além disso, o pH do meio e o tempo de tratamento também influenciam diretamente na

resistência da proteína, em relação à pressão aplicada e duração dos efeitos do pré-tratamento (AMBROSI *et al.*, 2016; HINRICHS; RADEMACHER, 2004).



**Figura 5** – Estratégias de uso da APH para melhorar a hidrólise enzimática. A) Pré-tratamento das proteínas seguida de hidrólise enzimática (Pré-tratamento – PT); B) tratamento de APH simultânea à hidrólise enzimática (hidrólise assistida - HA) e C) hidrólise convencional a pressão ambiente. (Fonte: Adaptado de MARCINIAK *et al.*, 2018)

Dessa forma, é importante que a hidrólise seja realizada imediatamente após a aplicação da APH, para evitar que as proteínas se reorganizem (BLAYO *et al.*, 2016). No entanto, é crucial avaliar cada proteína individualmente, pois a pressurização mais intensa pode levar à formação de agregados proteicos. Tal ocorrência foi observada por Xi e He (2018), em que a proteína da soja  $\beta$ -conglucina pressurizada a 300-400 MPa apresentou considerável perda da estrutura quaternária e terciária, porém à pressão de 500 MPa constatou-se agregação das moléculas, o que pode resultar em possível diminuição de eficiência em posterior processo de hidrólise (PEÑAS; PRÉSTAMO; GOMEZ, 2004; PERREAULT *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2012).

A hidrólise assistida por APH é outra estratégia para o uso da tecnologia de APH, conforme esquema apresentado na Figura 4B. Neste processo, tanto a proteína quanto a enzima são pressurizadas conjuntamente. Portanto, a hidrólise assistida por APH permite que a enzima entre em contato direto com os pontos de clivagem no momento que a pressão promove o desdobramento da proteína, o que pode potencializar o processo de hidrólise, pois

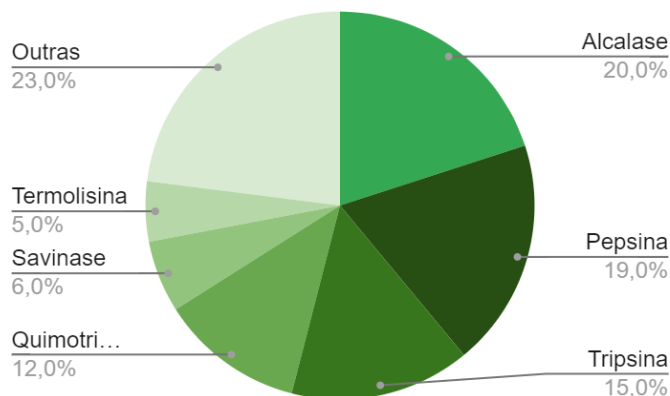
permite maior acessibilidade da enzima ao substrato e, conseqüentemente, uma proteólise mais intensa em um menor tempo de processo, sobretudo quando comparado ao método convencional realizado à pressão ambiente. Diversos estudos mostraram que a hidrólise assistida por APH é muito eficiente para promover uma proteólise mais intensa das proteínas da soja (PEÑAS, PRÉSTAMO; GOMEZ, 2004), grão de bico (ZHANG *et al.*, 2012), feijão (GARCIA-MORA *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2008), clara de ovo (HOPPE *et al.*, 2013), linhaça (FRANCK *et al.*, 2018) e soro de leite (LOZANO-OJALVO *et al.*, 2017), utilizando-se diferentes enzimas.

Além disso, a melhoria no processo durante a hidrólise assistida por APH também pode estar relacionada à ativação das enzimas, pois estas podem ser afetadas (ativadas ou inativadas) pela pressão por alterações na conformação e/ou na seletividade. No entanto, grande parte dos estudos relacionam a melhoria do processo apenas à desnaturação proteica, e pesquisas que discutam o papel do APH na ativação enzimática e na interação substrato-enzima durante a hidrólise assistida ainda são incipientes (MARCINIAK *et al.*, 2018; MOZHAEV *et al.*, 1994).

Neste contexto, a estabilidade e a sensibilidade da enzima à pressão devem ser consideradas, tanto quanto tais características das proteínas, para garantir que a enzima esteja ativa durante o tratamento e possa acessar os locais de clivagens no momento em que o substrato é desdobrado, permitindo, em consequência, a otimização do processo (MAYNARD *et al.*, 1998). Em estudo realizado por Bonomi e colaboradores (2003), foi verificada a barossensibilidade de quatro enzimas, dentre as quais a bromelina mostrou-se relativamente barossensível em pH neutro, apresentando 88% de atividade residual após 10 min a 600 MPa, seguida da tripsina, com 53% de atividade residual, enquanto a termolisina e a quimotripsina perderam 90% e 84% da atividade sob as mesmas condições, respectivamente. Zhang *et al.*, (2012) observaram que a atividade enzimática da alcalase foi melhorada à pressão de 200 MPa, enquanto o uso de pressões maiores que 400 MPa, reduziram a atividade enzimática significativamente, refletindo diretamente na eficiência da hidrólise. É evidente o efeito de ativação ou inativação enzimática provocadas pela pressão, mas, em geral, pressões entre 100 a 250 MPa, podem melhorar a atividade das enzimas, enquanto pressões superiores a 400 MPa podem ocasionar a inativação enzimática (CHAKRABORTY *et al.*, 2014; RASTOGI *et al.*, 2007). Portanto, para se obter a máxima eficiência da hidrólise assistida por APH, é importante conhecer a faixa de pressão que favoreça a enzima de escolha, como verificado por Zhou *et al.*, (2016) em que as hidrólises assistidas utilizando a papaína e alcalase foram maximizadas à pressão de 300 MPa, ao passo que a pepsina teve sua atividade maximizada a 400 MPa. Isso indica que a pressurização realmente pode causar alterações na atividade enzimática, resultando em aumento da interação com substrato ou modificação da seletividade até determinado nível de pressão. Todavia, pressões mais altas podem causar mudanças conformacionais nas enzimas, levando a completa inativação (YOO *et al.*, 2017).

A enzima utilizada e os parâmetros do processo são fundamentais para a obtenção de hidrolisados com propriedades melhoradas. Numerosos estudos foram realizados buscando otimizar os parâmetros do processo, onde a maioria se concentrou no uso das proteases alcalase, pepsina, tripsina e quimotripsina, como apresentado na Figura 5, o que abre uma nova perspectiva para pesquisas, visto que os tratamentos utilizando-se a APH pode exercer grande influência sobre as proteases.





**Figura 6** - Principais enzimas utilizadas nos estudos que avaliaram o efeito da APH na hidrólise enzimática que estão apresentadas na Tabela 3.

#### 1.4 Efeito da APH nas Propriedades dos Hidrolisados

As proteínas do soro de leite são uma excelente fonte de peptídeos com diferentes atividades biológicas, como elucidado em diversos estudos (ZHAO; ASHAOLU, 2020). No entanto, poucos estudos avaliaram o impacto da alta pressão hidrostática nas propriedades biológicas dos hidrolisados a partir das proteínas do soro de leite. Desse modo, para realizar uma análise mais profunda do uso da APH e verificar o efeito nas propriedades finais dos hidrolisados relacionados às propriedades bioativas como a atividade anti-hipertensiva e capacidade antioxidante, bem como na alergenicidade, foi realizada uma pesquisa considerando grande parte dos estudos que utilizaram a combinação da tecnologia de APH com a hidrólise enzimática em diferentes matrizes proteicas, como pode ser observado na Tabela 3.

##### 1.4.1 Efeito da APH na hidrólise das proteínas

O grau de hidrólise das proteínas é um parâmetro muito importante para acompanhar a produção de hidrolisados proteicos, pois está diretamente relacionado à eficiência do processo. A quantidade de ligações peptídicas rompidas em uma reação de proteólise determina, em termos quantitativos, o grau que uma fonte proteica foi hidrolisada. Desse modo, o número de ligações peptídicas quebradas em relação ao número total de ligações peptídicas inicial é definido como o grau de hidrólise (GH) (RUTHERFURD, 2010). O GH é o indicador mais utilizado para comparação entre os diferentes processos hidrolíticos e pode ser determinado por diferentes técnicas (RUTHERFURD, 2010).

De modo geral, o uso da APH como pré-tratamento ou simultâneo à hidrólise é uma ferramenta eficiente para aumentar o GH, como mostrado em diferentes estudos relacionados na Tabela 3. O desdobramento da proteína induzida pelo pré-tratamento com APH aumenta a eficiência da hidrólise, porém as respostas podem diferir diante da matriz proteica selecionada para realizar o processo. Em geral, o GH das proteínas de origem vegetal (lentilha, feijão e linhaça) foi mais expressivo quando submetidas ao pré-tratamento de APH utilizando a pressão de 300 MPa (AHMED *et al.*, 2019; AL-RUWAIH *et al.*, 2019; PERREAULT *et al.*, 2017). No entanto, o tratamento com pressões superiores a 400 MPa induziu o aumento da interação proteína-proteína e, conseqüentemente, reduziu o GH devido à diminuição da quantidade de sítios disponíveis para as enzimas. Por outro lado, para outras proteínas como a  $\beta$ -Lg (BOUKIL *et al.*, 2018; ZEECE; HUPPERTZ; KELLY, 2008) e as proteínas de

pedúnculo de cogumelos (ZHAO *et al.*, 2017), o uso de 400 MPa produziu hidrolisados com maior GH. Ao passo que as proteínas do ovo pré-tratadas à pressão de 550 MPa (SINGH; RAMASWAMY, 2014), 600 e 800 MPa (HOPPE *et al.*, 2013) apresentaram maior GH.

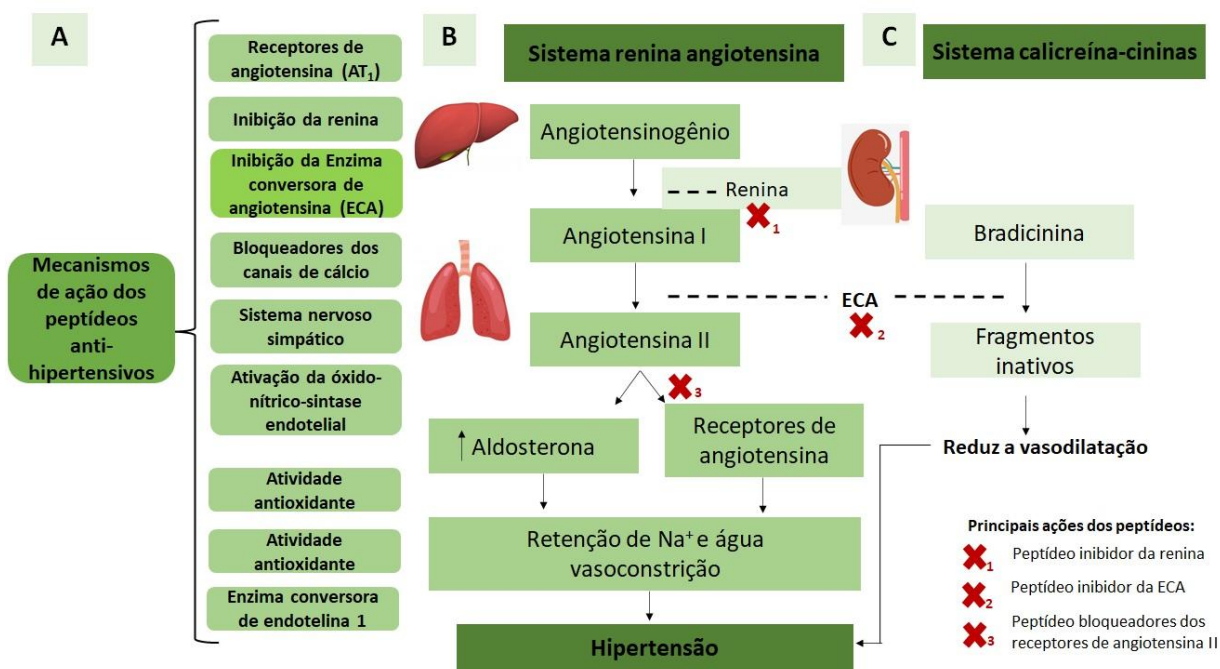
A hidrólise assistida por APH também é uma estratégia eficiente para potencializar a reação e reduzir significativamente o tempo de processo, principalmente quando comparado ao processo convencional, como pode ser observado na Tabela 3. No entanto, nos tratamentos de hidrólise assistida, a sensibilidade da enzima à pressão é um fator relevante e deve ser considerada ao se avaliar os parâmetros do processo. Em diversos estudos a enzima alcalase exibiu maior GH quando submetida a pressões inferiores a 200 MPa (GARCIA-MORA *et al.*, 2015; NAZIR; MU; ZHANG, 2020; PEÑAS *et al.*, 2006a; ZHANG; MU, 2017; ZHANG *et al.*, 2012). Por outro lado, o uso de 300-400 MPa parece ter sido mais eficiente para melhorar a hidrólise das enzimas pepsina e tripsina, por exemplo (BELLOQUE; CHICÓN; LÓPEZ-FENDIÑO, 2007; FRANCK *et al.*, 2018; LOZANO-OJALVO *et al.*, 2017; NAZIR; MU; ZHANG, 2020).

Apesar de o GH ser um critério importante para definir a eficiência do processo em termos hidrolíticos, não deve ser avaliado como critério único, sobretudo para a obtenção de hidrolisados com propriedades bioativas, já que nem sempre o maior GH reflete em maior efeito biológico e/ou redução da alergenicidade dos hidrolisados (CHEISON; KULOZIK, 2017).

#### **1.4.2 Efeito da APH na atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados**

A pressão arterial elevada é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, sendo uma das principais causas de morte em adultos (GOMES *et al.*, 2020). O interesse por terapias alternativas para o tratamento de hipertensão tem crescido, sobretudo devido aos efeitos colaterais que os tratamentos convencionais podem oferecer (PREMKUMAR; MALINI; ARUN JOSHY, 2019). Desse modo, os hidrolisados proteicos, preparados a partir de diferentes fontes alimentares, têm sido exaustivamente estudados, por potencialmente conterem potentes peptídeos biologicamente ativos que podem ser usados para o tratamento da hipertensão (MORALES-CAMACHO *et al.*, 2019; ZHOU; CHENG; LI, 2015).

Os peptídeos apresentam atividade anti-hipertensiva por meio de diferentes mecanismos. Existem evidências de que os peptídeos podem interagir com a renina, com receptores de angiotensina, com os canais de cálcio e com o sistema nervoso simpático, e ainda exercem efeitos sobre a função do sistema endotelina e na via do óxido nítrico (NO) (Figura 6A) (UDENIGWE; MOHAN, 2014). No entanto, o principal mecanismo estudado é a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). O sistema renina-angiotensina é um importante regulador da pressão arterial. A renina liberada do rim converte o angiotensinogênio em um peptídeo inativo, a angiotensina I (MAJUMDER; WU, 2015). A ECA hidrolisa este decapeptídeo em angiotensina II, que possui atividade vasoconstritora muito forte, regula o equilíbrio eletrolítico e exerce um estado pró-inflamatório (Figura 6B) (KOBORI *et al.*, 2007; MAJUMDER; WU, 2015). Além disso, a ECA também atua no sistema caliceína-cinina, promovendo a degradação de bradicinina, um peptídeo conhecido pela sua ação vasodilatadora (Figura 6C) (GOMES *et al.*, 2020). Portanto, a inibição da ECA é uma alternativa terapêutica para prevenir a hipertensão arterial e os peptídeos vêm sendo muito estudados quanto a capacidade de inibição deste sistema.



**Figura 7** – Mecanismos de ação dos peptídeos anti-hipertensivo (A); esquema da regulação da pressão arterial pelos sistemas renina-angiotensina (B) e caliceína-cinina (C) (Fonte: adaptado de GOMES et al., 2020).

Várias proteínas alimentares são estudadas como fontes de peptídeos anti-hipertensivos, mas ainda é um desafio desenvolver processos que apresentem máxima eficiência e sejam industrialmente viáveis. Além de buscar as melhores condições de hidrólise (enzima, tempo de reação, GH) para a produção de peptídeos, o uso de outras tecnologias com a APH, combinados com a hidrólise, pode ser importante para otimização da obtenção de hidrolisados com maior bioatividade. Embora muitas evidências demonstrem que a APH é apropriada para aumentar a eficiência em termos hidrolíticos, ainda existem poucos estudos que avaliaram a influência da APH na atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados, sobretudo quando comparado à produção de hidrolisados convencional. Apesar disso, todos os estudos que avaliaram o uso da APH associada à hidrólise exibiram hidrolisados com maior rendimento de peptídeos e elevada potência na inibição da ECA, como em proteína de batata-doce (NAZIR; MU; ZHANG, 2020), soja (GUAN *et al.*, 2018), feijão (GARCIA-MORA *et al.*, 2016), lentilha (GARCIA-MORA *et al.*, 2015), ervilha (CHAO *et al.*, 2013) e ovos (QUIRÓS *et al.*, 2007).

A geração de peptídeos com atividade inibitória da ECA dos hidrolisados podem ser influenciados por vários fatores, dos quais se destaca o tipo de proteína, a enzima e sua especificidade. Nazir, Mu e Zhang (2020) avaliaram o uso de diferentes enzimas que originaram peptídeos com capacidade de inibir a ECA, com atividades otimizadas em diferentes pressões. Resultados semelhantes foram observados por Garcia-Mora *et al.* (2015), ao avaliarem diferentes enzimas na produção de um hidrolisado. Guan *et al.* (2018) reportaram que a hidrólise assistida por APH da proteína de soja foi melhorada em todos os tratamentos utilizando a APH, porém a pressão de 200 MPa promoveu maior capacidade de inativar a ECA. Além disso, o uso da APH exige menor tempo de hidrólise para produzir hidrolisado com potencial anti-hipertensivo significativamente maior do que o obtido na hidrólise convencional (GARCIA-MORA *et al.*, 2015; GUAN *et al.*, 2018; QUIRÓS *et al.*, 2007). Por fim, Chao *et al.* (2013) observaram que o pré-tratamento com APH permitiu o uso

de menor relação enzima:substrato durante a hidrólise, gerando maior produção de peptídeos com capacidade de inibir a ECA e a renina, tornando o processo mais eficiente.

Como a APH promove o desdobramento da proteína, a taxa de hidrólise aumenta favorecendo a produção de maior quantidade de peptídeos ativos. Ao passo que a APH também contribui para a produção de peptídeos com menor massa molecular, que é diretamente correlacionado com aumento da atividade inibitória da ECA (ALUKO, 2015). Desse modo, a APH é uma tecnologia que favorece a obtenção de hidrolisados com maior atividade anti-hipertensiva, em menor tempo de processo e com menor concentração de enzimas, tornando o processo mais rápido e econômico, desde que os parâmetros do processo sejam avaliados cuidadosamente.

### 1.4.3 Efeito da APH na capacidade antioxidante dos hidrolisados

Os peptídeos com capacidade antioxidante têm recebido atenção significativa pela indústria, e podem ser incorporados em alimentos com a finalidade de conservar ou promover melhorias das características bioativas (TADESSE; EMIRE, 2020). A demanda por alimentos com poucos aditivos e que são promotores de saúde aumentaram acentuadamente, sobretudo diante das evidências da relação entre a dieta e a incidência de doenças crônicas. Desse modo, os peptídeos são uma opção natural para substituir os antioxidantes sintéticos e inibir a peroxidação lipídica, responsável por reduzir as características nutricionais, sensoriais e a validade dos alimentos. Além disso, podem agir sobre espécies reativas de oxigênio ou radicais livres que têm um papel significativo em muitos fenômenos biológicos, como danos celulares, envelhecimento e doenças crônicas como cardiovasculares, diabetes mellitus, distúrbios neurológicos e até mesmo doença de Alzheimer (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; HUANG; HSU; WANG, 2020; LORENZO *et al.*, 2018).

Os peptídeos antioxidantes podem atuar por diferentes formas para inibir a oxidação, principalmente na inativação de espécies reativas de oxigênio, eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição pró-oxidativos e redução de hidroperóxidos (ELIAS *et al.*, 2008). Normalmente, a eficiência dos antioxidantes pode ser avaliada por dois mecanismos principais: o *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) e o *Single Electron Transfer* (SET), que podem ocorrer isoladamente ou em paralelo. Os ensaios baseados no mecanismo HAT investigam a capacidade dos antioxidantes em bloquear a ação dos Radicais Peroxila (ROO<sup>•</sup>) por meio da doação de hidrogênio. Os métodos HAT mais comumente utilizados são: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Potential) e ensaio da peroxidação lipídica (LPA) (CASTELO-BRANCO e TORRES, 2011). Nos ensaios SET, a capacidade antioxidante é representada pela habilidade que o antioxidante possui para reduzir o composto oxidante por um tempo predeterminado. Os ensaios mais utilizados baseados no mecanismo SET incluem: FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*); TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), que parte da leitura da inibição do cátion radical ABTS (2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato), sal de diamônio); DPPH, que parte do sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

Durante a realização da proteólise, vários parâmetros devem ser observados para se obter hidrolisados com elevada capacidade antioxidante, porém a protease escolhida determina a composição e a sequência de aminoácidos e a massa molecular dos peptídeos, sendo características intimamente relacionados com o potencial antioxidante de hidrolisados (ZHOU *et al.*, 2016). A APH tem se mostrado como uma das tecnologias mais promissoras para contribuir com o aumento da produção de hidrolisados com maior capacidade antioxidante, com menor tempo de processo, sobretudo quando comparado com processo convencional (CHAO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2012). No entanto, mais uma vez, os

parâmetros do tratamento (pressão e tempo) podem impactar de forma diferente na capacidade antioxidante dos hidrolisados.

Dentre as funcionalidades dos peptídeos, a capacidade antioxidante foi a mais estudada em relação ao uso da APH. Diferentes pesquisadores mostraram que o tratamento prévio das proteínas, ou a hidrólise assistida por APH, pode aumentar a capacidade antioxidante dos hidrolisados (Tabela 1). Ahmed *et al.* (2019) verificaram que o PT a 300 MPa por 15 minutos aumentou a capacidade sequestrante do radical DPPH dos hidrolisados de proteína de lentilha. Resultados semelhantes foram observados por AL-RUWAIH *et al.* (2019) em hidrolisados de proteínas de feijão. Iskandar *et al.* (2015) pré-trataram a  $\beta$ -lactoglobulina com pressão de 550 MPa por 1 minuto e observaram que o hidrolisado obteve um aumento de 35% no FRAP em relação à proteína não tratada. Landim *et al.* (2021) também observaram aumento de 92% na capacidade antioxidante dos hidrolisados de soro de leite pré-tratados por APH quando comparado ao hidrolisado obtido na hidrólise convencional.

Além de potencializar a capacidade antioxidante dos hidrolisados, o uso da pressão pode impactar nos mecanismos de ação, como observado por Girgih *et al.* (2015), onde a pressão de 200 MPa favoreceu a produção de hidrolisados com maior capacidade de eliminação de superóxido e de radicais hidroxila, enquanto a pressão de 400 MPa foi mais eficaz para aumentar a capacidade de sequestrar o radical DPPH. Essa diferença pode ocorrer em função da mudança do perfil peptídico dos hidrolisados, como observado por Guan *et al.* (2018), em que o pré-tratamento utilizando pressões de 200 e 300 MPa favoreceu a produção de peptídeos não obtidos na hidrólise convencional. E essa diferença também pode ser observada entre os diferentes níveis de pressão, já que à 200 MPa foram identificados alguns peptídeos que não estavam presentes no tratamento a 300 MPa.

Além disso, o uso da APH pode reduzir o tempo necessário para se obter maior poder antioxidante dos hidrolisados (GARCIA-MORA, *et al.*, 2015; GARCIA-MORA *et al.*, 2016). No entanto, na hidrólise assistida, a pressão pode afetar positiva ou negativamente, conforme a enzima utilizada, como observado por Garcia-Mora *et al.* (2016), que reportaram tal procedimento para a proteína de feijão não aumentou a capacidade doadora de átomos de hidrogênio quando a enzima alcalase foi utilizada. Já os hidrolisados obtidos a partir da hidrólise assistida utilizando a savinase observou-se aumento da capacidade antioxidante conforme o aumento da pressão. Por outro lado, a pressão potencializou a capacidade de doação de elétrons para ambas as enzimas, resultando nos maiores valores com hidrólise assistida a 100 MPa para alcalase e 200 MPa para savinase. Resultados similares foram reportados por Garcia-Mora *et al.* (2015), que avaliaram o uso de diferentes enzimas na hidrólise de lentilha e verificaram que a APH aumentou a capacidade antioxidante de todos os tratamentos, porém os maiores valores foram obtidos utilizando a pressão de 100 MPa para alcalase, 200 MPa para protamex, 200 e 300 MPa para savinase e 300 MPa para colorase, evidenciando a importância da otimização dos parâmetros de tempo e pressão, conforme a enzima utilizada.

O aumento desta bioatividade nos hidrolisados após o uso da APH pode ser relacionado ao desdobramento da proteína ou à ativação enzimática, que potencializa a produção de peptídeos em termos qualitativos e quantitativos, conferindo maior capacidade antioxidantes por diferentes mecanismos. Além disso, vários estudos verificaram que a pressão aumenta a geração de peptídeos de baixa massa molecular, que geralmente apresentam bioatividades maiores. A capacidade antioxidante dos hidrolisados também vem sendo relacionada com uma ação conjunta entre peptídeos e aminoácidos livres (CORROCHANO *et al.*, 2019; ISKANDAR *et al.*, 2015). Vilela *et al.* (2006) verificaram maior quantidade e variedade de aminoácidos livres nos hidrolisados pressurizados, indicando que a pressão também favorece uma hidrólise mais intensa e, conseqüentemente, maior

liberação de aminoácidos, que podem contribuir para a capacidade antioxidante dos hidrolisados. Vários aminoácidos apresentam capacidade antioxidante, contudo a maioria dos aminoácidos reativos costuma conter cadeias laterais com enxofre nucleofílico (cisteína e metionina) ou cadeias laterais aromáticas (triptofano, tirosina e fenilalanina), das quais o hidrogênio é facilmente abstraído (ELIAS; KELLERBY; DECKER, 2008; POWER-GRANT *et al.*, 2016). Portanto, a APH pode intensificar a presença destes aminoácidos livres nos hidrolisados, bem como influenciar em sua posição específica na sequência do peptídeo, o que também pode contribuir para sua bioatividade.

#### **1.4.4 Efeito da APH na alergenicidade dos hidrolisados**

O aumento no número de casos de alergia alimentar vem se tornando uma preocupação mundial, sobretudo com a necessidade de atender à crescente demanda por proteínas alimentares (CHIZOBA *et al.*, 2018). A alergia alimentar é caracterizada por uma resposta excessiva do sistema imunológico contra determinadas substâncias presentes nos alimentos, conhecidas como alérgenos (SOMKUTI; SMELLER, 2013). As glicoproteínas hidrossolúveis com massa molecular entre 10 e 70 kDa têm sido descritas como os principais alérgenos alimentares, embora outros componentes também possam causar respostas imunológicas mediadas pela imunoglobulina E (IgE), não mediada pela IgE (células) ou pela mistura de ambos os mecanismos (SICHERER; SAMPSON, 2010; SOLÉ *et al.*, 2018).

Desse modo, a solução mais comum para diminuir a incidência de reações alérgicas é evitar completamente a ingestão do alérgeno, consistindo em uma iniciativa bastante difícil de ser viabilizada para alguns alimentos, como o leite ou o soro de leite, sendo ingredientes presentes em muitas categorias de alimentos. Assim, muitas pesquisas têm sido realizadas em busca da redução da antigenicidade das proteínas alimentares por meio de diferentes processos que podem reduzir a presença dos epítomos alergênicos (CHIZOBA *et al.*, 2018; VILLA *et al.*, 2018). O epítomo é a região da proteína que se liga aos receptores celulares e aos anticorpos. Dois tipos de epítomos podem ser identificados nas proteínas: os lineares, sendo sequências de aminoácidos específicos localizados na estrutura primária da proteína; e os conformacionais, que combinam aminoácidos de diferentes regiões da proteína que são dobradas em cadeias polipeptídicas (ABD EL-SALAM e EL-SHIBINY, 2019).

Os epítomos conformacionais podem ser destruídos pela alteração da estrutura ou agregação das proteínas, contudo, os epítomos lineares de ligação IgE permanecem intactos, pois a estrutura primária não é alterada pela desnaturação (RAHAMAN; VASILJEVIC; RAMCHANDRAN, 2016). Para que ocorra a redução da presença dos epítomos lineares nas proteínas, é necessário usar processos que provoquem alteração na estrutura primária, como a hidrólise enzimática, que é um processo eficaz na redução da alergenicidade (KASERA *et al.*, 2015). Apesar disso, as proteínas dos alimentos podem ser resistentes à proteólise e seus fragmentos podem manter a capacidade de sensibilização após a hidrólise, caso a sequência do epítomo seja preservada, apesar da hidrólise parcial da proteína. Portanto, qualquer método único poderá se mostrar insuficiente para reduzir o alérgeno alimentar e alcançar um resultado satisfatório (SICHERER; SAMPSON, 2010), tornando a combinação do uso APH com hidrólise enzimática uma estratégia que pode resultar em possível solução para as proteínas concentradas e isoladas, das mais diversas fontes alimentares.

A combinação da APH com a hidrólise enzimática tem apresentado efeito significativo na redução da alergenicidade das proteínas do soro de leite quando comparado à hidrólise convencional (PEÑAS *et al.*, 2006b; PEÑAS *et al.*, 2006c) ou apenas pressurização (MENG *et al.*, 2017). As alterações causadas pela APH expõem novos pontos de clivagem, incluindo os epítomos que ficam mais susceptíveis à ação enzimática e, conseqüentemente, pode favorecer uma maior redução da antigenicidade (ZEECE; HUPPERTZ; KELLY, 2008). No entanto, a utilização dessa estratégia para a redução da alergenicidade das proteínas requer um

estudo sistemático das condições de processo como, por exemplo, a escolha de enzimas, proteína, nível de pressão, duração do tratamento, dentre outros fatores.

A maneira como a APH é combinada com a hidrólise enzimática pode afetar as características imunoquímicas dos hidrolisados, como relatado por Chicón *et al.* (2008), em que o pré-tratamento por APH da  $\beta$ -Lg não apresentou diferença na imunorreatividade em relação ao hidrolisado convencional. No entanto, o uso da hidrólise assistida por APH utilizando a pressão de 400 MPa por 20 min foi suficiente para que os hidrolisados não apresentassem ligações do tipo IgE significativas (CHICÓN *et al.*, 2009). Apesar disso, o pré-tratamento da  $\beta$ -Lg com pressões superiores a 600 MPa, seguida de hidrólise, pode ser uma alternativa para reduzir significativamente a reatividade *in vitro* com IgE de indivíduos alérgicos, quando testado por ELISA indireto (BONOMI *et al.*, 2003).

Além disso, o tempo de hidrólise é outro parâmetro importante. Em geral, o uso da APH pode favorecer a hidrólise da proteína nativa nos primeiros minutos de reação, porém pode não ser suficiente para redução da imunorreatividade dos hidrolisados, pois os fragmentos proteicos gerados no início da reação ainda podem conter os epítomos imunorreativos intactos (LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2008). López-Expósito *et al.* (2008) relataram que a imunorreatividade das proteínas de ovoalbumina hidrolisadas sob pressão diminuíram com o aumento do tempo de tratamento, porém ainda mantiveram pequena ligação residual perceptível à IgE de pacientes alérgicos ao ovo. Resultados semelhantes foram encontrados por Chicón *et al.* (2009) e Chicón *et al.* (2008), em que as proteínas do soro de leite hidrolisadas a pressão de 400 MPa apresentaram redução da antigenicidade progressiva com o tempo de tratamento, principalmente, em relação à proteína não pressurizada e hidrolisadas a pressão ambiente, porém as reações contra IgE ainda foram perceptíveis.

Paralelamente, Peñas *et al.* (2006c) reportaram que as enzimas podem apresentar diferenças quanto às características imunoquímicas dos hidrolisados, visto que a enzima colorase foi capaz de gerar maior redução da imunorreatividade das proteínas do soro de leite do que a enzima neutrase, nas mesmas condições de pressão e tempo. Corroborando com tais observações, Boukil *et al.* (2020) revelaram que a hidrólise das proteínas de lava de farinha, a pepsina exibiu capacidade mais expressiva de hidrolisar as proteínas alergênicas do que a alcalase, mesmo a alcalase exibindo maior grau de hidrólise. Desse modo, fica evidente que as enzimas utilizadas tem relevância para se obter sucesso na redução da imunorreatividade das proteínas hidrolisadas sob APH, visto que a especificidade da enzima determina os pontos de clivagem e a redução dos epítomos lineares (DAMODARAN; LI, 2017; PEÑAS *et al.*, 2006c).

Embora a APH favoreça as mudanças na conformação das proteínas que facilitam a alteração dos epítomos conformacionais, promova maior grau de hidrólise e a redução dos epítomos lineares, ainda é necessário ser demonstrado se a maioria dos peptídeos formados retém apenas um ou mais epítomos de ligação de IgE relevantes. Estudos *in vivo* realizados por López-Expósito *et al.* (2012) em camundongos sensibilizados provaram que hidrolisados sob alta pressão hidrostática (400 MPa) de  $\beta$ -Lg são imunologicamente inertes. Em estudo realizado por Lozano-Ojalvo *et al.* (2017), os hidrolisados tratados a 400 MPa apresentaram presença de epítomos alergênicos de  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, porém no teste realizado *in vivo* não foram perceptíveis reações como alteração de temperatura corporal, anafilaxia e sinais ou liberação de marcadores nos camundongos sensibilizados com o alérgeno. O estudo evidenciou que a APH pode produzir, em pouco tempo, hidrolisado hipoalergênico, sem a capacidade de estimular a produção de IgE e IgG.

Por fim, o desdobramento proteico induzido pelo tratamento de APH facilita a hidrólise enzimática, resultando em fragmentos de peptídeo mais curtos (7 e 10 resíduos de aminoácidos), que pode não ter epítomos suficientes para reagir com anticorpos, levando à redução da alergenicidade (BØGH; BARKHOLT; MADSEN, 2015; ZEECE; HUPPERTZ;

KELLY, 2008). Levando isso em conta e considerando que o padrão peptídico e a imunorreatividade dos hidrolisados obtidos sob APH podem ser alterados pela seleção da enzima, pressão e tempo de hidrólise apropriados, pode ser possível obter hidrolisados com alergenicidade reduzida sem sensibilizar os pacientes susceptíveis a um determinado alérgeno, além de ser capaz de ajudar o sistema imunológico a desenvolver tolerância às proteínas em tratamentos terapêuticos (LÓPEZ-EXPÓSITO *et al.*, 2012; LOZANO-OJALVO *et al.*, 2017).



**Tabela 3** – Aplicação da APH como ferramenta para melhorar a hidrólise enzimática de proteínas alimentares, bem como as propriedades biológicas e alergênicas do hidrolisados

Fonte	Parâmetros APH (pressão/tempo)	Enzima	Principais Resultados	Referência
Proteínas do soro de leite	100, 250, 400 MPa/20 e 35 min (HA e PT)	pepsina	O tratamento assistido intensificou a hidrólise das proteínas do soro de leite e reduziu o tempo de processamento. O pré-tratamento melhorou a capacidade antioxidante dos hidrolisados finais.	(LANDIM <i>et al.</i> , 2021)
Proteína de lava de farinha	380 MPa/ 1 min (PT e HA)	Alcalase® e pepsina	A hidrólise assistida foi acentuada por ambas as enzimas, com maior hidrólise de proteínas alergênicas específicas.	(BOUKIL <i>et al.</i> , 2020)
Proteína de batata doce	100, 200 e 300 MPa/ 60 min (HA)	Papaína, pepsina, Alcalase®	Aumento significativo do grau de hidrólise e da atividade inibitória da ECA em todos os hidrolisados avaliados	(NAZIR; MU; ZHANG, 2020)
Proteína do soro de leite	100, 200, 300, 400, 500, 600 MPa/ 15-30 min (HA)	Bromelina e $\alpha$ -quimotripsina	A pressão de 400 MPa promoveu maior alteração estrutural e menor taxa de redobramento após a despressurização, aumentando o grau de hidrólise de ambas as enzimas	(CARULLO <i>et al.</i> , 2020)
Larva de farinha e carne de grilo	200 e 380 MPa/1 min (PT)	Alcalase®	Efeito da pressão foi observado somente na hidrólise da larva de farinha	(DION-POULIN <i>et al.</i> , 2020)
Lentilha	300, 400 e 600 MPa/ 15 min (PT)	Alcalase®	O pré-tratamento não aumentou o grau de hidrólise, porém o tratamento com 300 MPa melhorou a capacidade antioxidante dos hidrolisados	(AHMED <i>et al.</i> , 2019)
Proteína de feijão	300, 400 e 600 MPa/ 15 min (PT)	Alcalase®	Aumento da eficiência da hidrólise, apresentando melhor desempenho à 300 MPa para a atividade de eliminação do radical DPPH	(AL-RUWAIH <i>et al.</i> , 2019)
Proteína de soja	80, 100, 120, 200 e 300 MPa/ 0, 1, 2, 3 e 4 h (PT)	Colorase PP®	Todos os tratamentos aumentaram a taxa de hidrólise, a capacidade antioxidante e a atividade inibitória da ECA dos hidrolisados, exceto 300 MPa	(GUAN <i>et al.</i> , 2018)
$\beta$ -Lg	400 e 600 MPa/ 10 min (PT)	Tripsina	A pressurização a 400 MPa aumentou a eficiência do processo de hidrólise modificou o perfil peptídico dos hidrolisados quando comparado ao tratamento a 600 MPa e à proteína não pressurizada	(BOUKIL <i>et al.</i> , 2018)
Proteína de linhaça	100 e 300 MPa/ 5 e 10 min (HA)	Tripsina	A pressão de 300 MPa causou maior alteração estrutural, gerando hidrolisados com maior grau de hidrólise e maior capacidade antioxidante	(FRANCK <i>et al.</i> , 2018)
Proteína de pé de cogumelo	100 – 500 MPa/ 10 min (PT); 200 MPa/2, 6, 10, 15,18 min (PT)	Protease Alcalina	Aumento da atividade da protease, com melhor desempenho no tratamento à 400 MPa/ 10 min	(ZHAO <i>et al.</i> , 2017)
Proteína do soro de leite	400 MPa/ 30 min (HA)	Pepsina	Máxima hidrólise com peptídeos que variaram entre 10 e 3 kDa (50%), com redução de alérgenos intactos e sem indução de sinais clínicos em camundongos sensibilizados	(LOZANO-OJALVO <i>et al.</i> , 2017)

Continua.

**Tabela 3 - Continuação.**

Fonte	Parâmetros APH (pressão/tempo)	Enzima	Principais Resultados	Referência
Fosvitina	50 e 100 MPa / 24h (HA)	Alcalase <sup>®</sup> , Elastase <sup>®</sup> , Savinase <sup>®</sup> , Termolisina <sup>®</sup> tripsina	Os hidrolisados produzidos a 100 MPa exibiram maior grau de hidrólise, maior poder redutor e atividade sequestrante de radicais livres em comparação com os obtidos à pressão atmosférica	(YOO <i>et al.</i> , 2017)
Caseína	50, 100 e 200 MPa / 15, 30, 60 e 120 min (HA)	Alcalase <sup>®</sup> , Elastase <sup>®</sup> , Savinase <sup>®</sup> , Termolisina <sup>®</sup> tripsina	A hidrólise assistida por APH favoreceu a produção de hidrolisados com maior grau de hidrólise e capacidade antioxidante	(BAMDAD <i>et al.</i> , 2017a)
$\beta$ -Lactoglobulina	100 MPa/ 2h (HA)	Neutrased <sup>®</sup> , Alcalased <sup>®</sup> , Savinased <sup>®</sup> , Elastased <sup>®</sup> , Termolisina e tripsina	O tratamento de APH melhorou o grau de hidrólise e a capacidade de eliminação de radical e a capacidade de redução de todos os tratamentos	(BAMDAD <i>et al.</i> , 2017b)
Proteína de linhaça	600 MPa/ 5 e 10 min (PT)	Tripsina e tripsina-pronase	O tratamento de APH aumentou a proteólise e a capacidade antioxidante dos hidrolisados	(PERREAULT <i>et al.</i> , 2017)
Proteína de batata-doce	100, 200 e 300 MPa/ 30 e 60 min (HA)	Alcalased <sup>®</sup>	Aumento no grau de hidrólise e na capacidade antioxidante	(ZHANG; MU, 2017)
Proteína concentrada de feijão	100 e 200 MPa/15 min (HA)	Alcalased <sup>®</sup> e Savinased <sup>®</sup>	A hidrólise foi melhorada em todos os tratamentos, enquanto a atividade inibitória da ECA foi melhorada usando a pressão de 100 e 200 MPa para Alcalased <sup>®</sup> e 200 MPa para Savinased <sup>®</sup> . Já os valores de ORAC tiveram aumento somente dos hidrolisados obtidos pela Savinased <sup>®</sup> , porém a capacidade doadora de elétrons foi melhorada para ambas as enzimas	(GARCIA-MORA <i>et al.</i> , 2016)
Semente de Ginkgo	200, 300, 400 MPa/ 20 min (PT)	Pepsina, Neutrased <sup>®</sup> , Alcalased <sup>®</sup> papaína	O tratamento de APH melhorou a ação hidrolítica das enzimas, e contribuiu para a redução da alergenicidade usando a pressão de 300 MPa para papaína e Alcalased <sup>®</sup> e 400 MPa para pepsina	(ZHOU <i>et al.</i> , 2016)
Proteína do soro de leite	100, 200, 300, 400 MPa/ 5, 15, 30 min (HA)	Bromelina e $\alpha$ -quimotripsina	Em todos os tratamentos as hidrólises foram melhoradas	(AMBROSI <i>et al.</i> , 2016)
Proteína do soro de leite	300 MPa/15 min (PT)	Tripsina	A pressurização induziu mudanças estruturais da proteína que favoreceram a acessibilidade e a atividade da tripsina	(BLAYO <i>et al.</i> , 2016)
Lentilha	100, 200, 300, 400 e 500 MPa / 15 min (HA)	Alcalased <sup>®</sup> , Savinased <sup>®</sup> , Promatex <sup>®</sup> . Colorased <sup>®</sup>	Somente as pressões abaixo de 300 MPa aumentaram a eficiência proteolítica das enzimas. O uso da APH favoreceu aumento da capacidade antioxidante e da atividade inibitória da ECA dos hidrolisados, exceto para Alcalased <sup>®</sup>	(GARCIA-MORA <i>et al.</i> , 2015)
Proteína isolada do soro de leite	550 MPa/ 1 min (PT)	Pepsina, tripsina, quimitripsina e peptidase	Melhorou a digestibilidade <i>in vitro</i> , modificou o perfil peptídico e melhorou a capacidade antioxidante dos hidrolisados	(ISKANDAR <i>et al.</i> , 2015)

Continua.

**Tabela 3 - Continuação.**

Fonte	Parâmetros APH (pressão/tempo)	Enzima	Principais Resultados	Referência
Proteína isolada da ervilha	200, 400, 600 MPa/ 5 min (PT)	Alcalase®	A pressão de 200 MPa favoreceu maior liberação de peptídeos com capacidade de eliminar os radicais superóxido e hidroxila e a pressão de 400 MPa favoreceu a liberação de peptídeos com maior capacidade de sequestrar os radicais de oxigênio e DPPH	(GIRGIH <i>et al.</i> , 2015)
Proteína da clara de ovo	350, 450, 550 MPa/ 5, 10, 15 min (PT)	Tripsina	O maior nível de pressão associado ao maior tempo de tratamento aumentou o grau de hidrólise	(SINGH; RAMASWAMY, 2014)
Proteína da batata-doce	100, 200, 300, 400 e 600 MPa/20 min (PT)	Pepsina e pancreatina	O tratamento não melhorou a digestibilidade das proteínas	(SUN <i>et al.</i> , 2014)
Proteína de ervilha isolada	200, 400 e 600 MPa/ 5 min (PT)	Alcalase®	Maior produção de peptídeos inibidores de ECA e renina utilizando menor concentração de enzimas	(CHAO <i>et al.</i> , 2013)
Clara de ovo	400, 600 e 800 MPa/ 5 min (PT)	Pepsina	O PT utilizando a pressão de 600 e 800 MPa foram mais efetivos para aumentar a digestibilidade das diferentes proteínas da clara de ovo	(HOPPE <i>et al.</i> , 2013)
Proteína isolada do grão-de-bico	100, 200, 300, 400, 500, 600 MPa (PT); 100, 200, 300 MPa (HA)	Alcalase®	O pré-tratamento a 300 e 400 MPa e a hidrólise assistida a 200 MPa/30 min foram mais efetivos para aumentar o grau de hidrólise e a capacidade antioxidante dos hidrolisados	(ZHANG <i>et al.</i> , 2012)
$\beta$ -Lg	400 MPa/20 e 5 min (HA)	Quimotripsina	Redução da alergenicidade <i>in vivo</i> com tempo menor de incubação	(LÓPEZ-EXPÓSITO <i>et al.</i> , 2012)
Gelatina de peixe	100-300 MPa/15 e 30 min (HA)	Alcalase®, Colagenase, tripsina e pepsina	Melhorou a atividade hidrolítica das quatro enzimas avaliadas e a capacidade de eliminação radical dos hidrolisados produzidos pela Alcalase® e colagenase	(ALEMÁN <i>et al.</i> , 2011)
Hemoglobina	400 MPa/ 15 min (PT)	Tripsina e pepsina	Aumentou a hidrólise e reduziu o tempo de incubação da enzima tripsina	(TOLDRÀ <i>et al.</i> , 2011)
Proteínas do soro de leite	200 e 400 MPa/ 10, 30 e 60 min (HÁ)	Pepsina e quimotripsina	A APH aumentou a hidrólise das principais proteínas do soro de leite, com maior produção de peptídeos e alergenicidade reduzida com menor tempo	(CHICÓN <i>et al.</i> , 2009)
$\beta$ -Lg	400, 600, 800 MPa/10 min (PT)	Pepsina	As pressões de 600 e 800 MPa foram mais efetivas para aumentar a hidrólise da $\beta$ -Lg, com a produção de fragmentos de peptídeos mais curtos	(ZEECE <i>et al.</i> , 2008)
Proteína de feijão	200, 400 e 600 MPa / 20 min (PT)	Tripsina	As pressões de 400 MPa e 600 MPa diminuíram a digestibilidade da proteína devido ao aumento da formação de agregados	(YIN <i>et al.</i> , 2008)

Continua.

**Tabela 3 - Continuação.**

Fonte	Parâmetros APH (pressão/tempo)	Enzima	Principais Resultados	Referência
Ovoalbumina	400 MPa/ 10, 60 e 120 mim (HA)	Pepsina	Completa hidrólise das proteínas em 10 minutos de reação, com a redução progressiva da capacidade de ligação IgG e IgE dos hidrolisados conforme o aumento do tempo de processamento	(LÓPEZ-EXPÓSITO <i>et al.</i> , 2008)
$\beta$ -Lg A	100 – 400 MPa / 5, 10 e 20 min (HA) 100-400 MPa/20 min (PT)	Pepsina	Pouco efeito do PT nas características dos hidrolisados. A HA a 400 MPa favoreceu a completa redução da $\beta$ -Lg e diminuiu progressivamente a antigenicidade e capacidade de ligação IgE conforme aumentou o tempo	(CHICÓN <i>et al.</i> , 2008)
$\beta$ -Lg	100, 200, 300, 400 MPa/ 5, 10 e 20 min (HA); 200 – 400 / 20 mim (PT)	Pepsina, quimotripsina	A HA por APH utilizando a enzima quimotripsina foi melhorada com o uso de pressões superiores a 100 MPa e para pepsina a 400 MPa, enquanto o PT apenas a pressão de 400 MPa apresentou efeito na hidrólise da quimotripsina	(BELLOQUE; CHICÓN; LÓPEZ-FENDIÑO, 2007)
Ovoalbumina	100-400 MPa/ 5-60 min (HA)	Pepsina, quimotripsina e tripsina	A pressão de 400 MPa aumentou a hidrólise, porém não melhorou a atividade inibitória da ECA, mas as pressões de 200–400 MPa aceleraram a liberação dos peptídeos com efeitos anti-hipertensivos quando a pepsina foi usada	(QUIRÓS <i>et al.</i> , 2007)
$\beta$ -Lg A	100 – 400 MPa / 5, 10 e 20 min (HA); 100-400 MPa/ 20 min (PT)	Quimotripsina	A hidrólise assistida promoveu completa hidrólise e reduziu o tempo de processo, enquanto o pré-tratamento apenas aumentou a susceptibilidade e acelerou o processo	(CHICÓN <i>et al.</i> , 2006)
Proteínas do soro de leite	100, 200, 300/ 15 min (PT e HA)	Tripsina, $\alpha$ -quimotripsina, pepsina	A hidrólise assistida aumentou a eficiência do processo e reduziu a imunorreatividade das proteínas do soro de leite	(PEÑAS <i>et al.</i> , 2006a)
Proteína do soro de soja	100,200 e 300 MPa/ 15 min (HA)	Alcalase®, Neutrase e Colorase	Aumentou o grau de hidrólise e a pressão de 300 MPa contribuiu para a redução da imunorreatividade do hidrolisado obtido a partir da Neutrase.	(PEÑAS <i>et al.</i> , 2006b)
Proteína rada do soro de soja	100 e 200 MPa/ 15 min (PT e HA)	Tripsina, quimotripsina e pepsina	Aumentou o grau de hidrólise e reduziu a alergenicidade das proteínas	(PEÑAS; PRÉSTAMO; GOMEZ 2004)
$\beta$ -lg	600 MPa/10 min (PT e HA)	Tripsina, quimotripsina, bromelina e termolisina	A hidrólise assistida não aumentou a eficiência da hidrólise devido à sensibilidade das enzimas, porém o pré-tratamento contribuiu para o aumento	(BONOMI <i>et al.</i> , 2003)
$\beta$ -Lg A	150, 300, 450 MPa/ 15 min (PT)	<i>Bacillus licheniformis</i> proteinase, $\alpha$ -quimotripsina, tripsina	As pressões mais elevadas (300 e 450 MPa) aumentaram a taxa de hidrólise de 5 a 10 vezes das três enzimas testadas	(KNUDSEN <i>et al.</i> , 2002)

PT - Pré-tratamento; HA - Hidrólise assistida

## REFERÊNCIAS

- ABADÍA-GARCÍA, L. *et al.* Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 84–90, 2016.
- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1119–1132, 2017.
- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Reduction of milk protein antigenicity by enzymatic hydrolysis and fermentation. A Review. **Food Reviews International**, p. 1–20, 2019.
- AHMED, J. *et al.* Effect of high-pressure treatment prior to enzymatic hydrolysis on rheological, thermal, and antioxidant properties of lentil protein isolate. **Legume Science**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2019.
- AL-RUWAIH, N. *et al.* High-pressure assisted enzymatic proteolysis of kidney beans protein isolates and characterization of hydrolysates by functional, structural, rheological and antioxidant properties. **Food Science and Technology**, v. 100, p. 231–236, 2019.
- ALEMÁN, A. *et al.* Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 6, p. 1129–1136, 2011.
- ALUKO, R. E. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, p. 44–50, 2015.
- ALVES, M. P. *et al.* Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, 2014. v. 69, n. 3, p. 212.
- AMBROSI, V. *et al.* High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 294–301, 2016.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Ed. Manole, p.142, 2003.
- ANUSHA, R.; O. S. BINDHU. Bioactive Peptides from Milk. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects [S.l.]: [s.n.], 2016, V. 1, p. 13.*
- ATRA, R. *et al.* Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 3, p. 325-332, 2005.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 2011.
- BAMDAD, F.; *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of casein hydrolysate produced using high hydrostatic pressure combined with proteolytic enzymes. **Molecules**, v. 22, 2017a.
- \_\_\_\_\_; *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptides released from  $\beta$ -lactoglobulin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis fatemeh. **Molecules**, v. 22, p. 1–15, 2017b.
- BELLOQUE, J.; CHICÓN, R.; LÓPEZ-FENDIÑO, R. Unfolding and refolding of  $\beta$ -lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5282–5288, 2007.
- BLAYO, C. *et al.* Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure. **Food Research International**, v. 79, p. 40–53, 2016.
- BØGH, K. L.; BARKHOLT, V.; MADSEN, C. B. Characterization of the immunogenicity and allergenicity of two cow's milk hydrolysates - A study in brown norway rats.

**Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 5, p. 274–283, 2015.

BONOMI, F. *et al.* Reduction of immunoreactivity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 1, p. 51–59, 2003.

BOUKIL, A. *et al.* Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated B-lactoglobulin. **Journal of Membrane Science**, v. 556, p. 42–53, 2018.

\_\_\_\_\_ *et al.* High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis Affect Mealworm Allergenic Proteins. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 1–14, 2020.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÉA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.

BU, G. *et al.* Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: A mini-review. **Dairy Science and Technology**, v. 93, n. 3, p. 211–223, 2013.

CARTER, B. G.; DRAKE, M. A. Invited review: The effects of processing parameters on the flavor of whey protein ingredients. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6691–6702, 2018.

CARULLO, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FERRARI, G. Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, 2020.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, 2013. v. 445–446, p. 385–396.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: Determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.

CASTRO, R. J. S. *et al.* Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications. **Food Structure**, p. 1–13, 2017.

CHAKRABORTY, S. *et al.* High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 578–596, 2014.

CHAO, D. *et al.* Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1528–1534, 2013.

CHAWLA, R.; PATIL, G. R.; SINGH, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 260–268, 2011.

CHEISON, S. C.; KULOZIK, U. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 418–453, 2017.

CHICÓN, R. *et al.* Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin e binding of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 928–938, 2008.

\_\_\_\_\_ *et al.* Changes in chymotrypsin hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin A induced by high hydrostatic pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2333–2341, 2006.

\_\_\_\_\_ *et al.* Food Hydrocolloids Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloid**, v. 23, p. 593–599, 2009.

CHIZOBA EKEZIE, F. G.; CHENG, J. H.; SUN, D. W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. **Trends in Food Science and Technology**, v. 74, p. 12–25, 2018.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254–262, 2000.

CÓRDOVA-DÁVALOS, L. E.; JIMÉNEZ, M.; SALINAS, E. Glycomacropptide bioactivity and health: A review highlighting action mechanisms and signaling pathways. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 2019.

CORROCHANO, A. R. *et al.* Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, 2019.

DAMODARAN, S.; LI, Y. A two-step enzymatic modification method to reduce immuno-reactivity of milk proteins. **Food Chemistry**, v. 237, p. 724–732, 2017.

DION-POULIN, A. *et al.* Functionality of cricket and mealworm hydrolysates generated after pre-treatment of meals with high hydrostatic pressures. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, 2020.

DULLIUS, A., GOETTERT, M. I., DE SOUZA, C. F. V. Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 57–74, 2018.

EDWARDS, P. J. B.; JAMESON, G. B. Structure and stability of whey proteins. **Milk Proteins**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Inc., p. 201–242, 2014.

EL-AGAMY, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 64–72, 2007.

ELIAS, R. J.; KELLERBY, S. S.; DECKER, E. A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 430–441, 2008.

FRANCK, M. *et al.* High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. **Food Research International**, v. 115, p. 467–473, 2018.

GAPPER, L. *et al.* Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 93–109, 2007.

GARCIA-MORA, P. *et al.* High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. **Food Chemistry**, v. 171, p. 224–232, 2015.

GARCIA-MORA, P. *et al.* High-pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increases angiotensin converting enzyme i inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 8, p. 1730–1740, 2016.

GIRGIH, A. T. *et al.* Enzymatic protein hydrolysates from high pressure-pretreated isolated pea proteins have better antioxidant properties than similar hydrolysates produced from heat pretreatment. **Food Chemistry**, v. 188, p. 510–516, 2015.

GOMES, C. *et al.* Current genetic engineering strategies for the production of antihypertensive ACEI peptides. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 8, p. 2610–2628, 2020.

GOYAL, A. *et al.* High Pressure Processing and Its Impact on Milk Proteins: A Review. **Journal of Dairy Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 2319–3409, 2013.

GUAN, H. *et al.* The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 245, p. 89–96, 2018.

HENDRICKX, M. *et al.* Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 197–203, 1998.

HINRICHS, J.; RADEMACHER, B. High pressure thermal denaturation kinetics of whey proteins. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 4, p. 480–488, 2004.

HOPPE, A. *et al.* Effect of high pressure treatment on egg white protein digestibility and peptide products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 17, p. 54–62,

2013.

HUANG, H.-W.; HSU, C.-P.; WANG, C.-Y. Healthy Expectations of hydrostatic pressure treatment in food processing industry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, p. 1–13, 2020.

HUPPERTZ, T. *et al.* High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 593–598, 2006.

\_\_\_\_\_; FOX, P. F.; KELLY, A. L. High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 489–495, 2004.

ISKANDAR, M. M. *et al.* High Hydrostatic Pressure Pretreatment of Whey Protein Isolates Improves Their Digestibility and Antioxidant Capacity. **Foods**, v. 4, n. 2, p. 184–207, 2015.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. *et al.* Recent developments in the detection of bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 602–617, 2019.

JERVIS, S. *et al.* Effect of bleaching whey on sensory and functional properties of 80% whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 2848–2862, 2012.

KASERA, R. *et al.* Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 76, p. 54–60, 2015.

KILARA, A.; VAGHELA, M. N. **Whey proteins**. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2018.

KNUDSEN, J. C. *et al.* Effect of high hydrostatic pressure on the conformation of  $\beta$ -lactoglobulin A as assessed by proteolytic peptide profiling. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 10, p. 791–803, 2002.

KOBORI, H. *et al.* Intratubular renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 251–287, 2007.

KUSSENDRAGER, K. D.; HOOIJDONK, A. C. M. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **British Journal of Nutrition**, v. 84, 2000.

LANDIM, A. P. M. *et al.* Effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant capacity and peptic hydrolysis of whey proteins. **Ciência Rural**, v. 51, n. 4, p. 1 - 12, 2021.

LOPEZ-EXPÓSITO, I. *et al.* In vivo methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of  $\beta$ -lactoglobulin are immunologically inert. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 541–548, 2012.

LÓPEZ-EXPÓSITO, I. *et al.* Changes in the Ovalbumin Proteolysis Profile by High Pressure and Its Effect on IgG and IgE Binding. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11809–11816, 2008.

LOPEZ-FANDIÑO, R.; CARRASCOSA, A. V.; OLANO, A. The Effects of High Pressure on Whey Protein Denaturation and Cheese-Making Properties of Raw Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 929–936, 1996.

LORENZO, J. M. *et al.* Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 136–147, 2018.

LOZANO-OJALVO, D. *et al.* Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 154–162, 2017.

LULLIEN-PELLERIN, V.; BALNY, C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties: Conformational modification, activity and oligometric dissociation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, n. 3, p. 209–221, 2002.

MADUREIRA, A. R. *et al.* Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 437–455, 2010.

MAYNARD, F. *et al.* Effect of High-pressure Treatment on the Tryptic Hydrolysis of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin AB. **International Dairy Journal**, v. 8 p. 125–133, 1998.



MAJUMDER, K.; WU, Jianping. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 256–283, 2015.

MARCINIAK, A. *et al.* Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, p. 187–198, 2018.

MAUX, S. LE *et al.* Bovine  $\beta$ -lactoglobulin/fatty acid complexes: Binding, structural, and biological properties. **Dairy Science and Technology**, v. 94, n. 5, p. 409–426, 2014.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; RAMÍREZ-SUÁREZ, J. C.; YADA, R. Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2147–2163, 2018.

MENG, X. *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 219, p. 290–296, 2017.

MICINSKIA, J. *et al.* Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. **Polish Annals of Medicine**, v. 20, n. 1, p. 69–76, 2013.

MORAIS, A. C. N.; FERREIRA, E. H. D. R.; ROSENTHAL, A. Aplicação de alta pressão isostática na produção de derivados lácteos: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 357, 2014.

MORALES-CAMACHO, J. I. *et al.* Insertions of antihypertensive peptides and their applications in pharmacy and functional foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 6, p. 2493–2505, 2019.

MOZHAEV, V. V. *et al.* Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 12, p. 493–501, 1994.

NAZIR, M. A.; MU, T. H.; ZHANG, M. Preparation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sweet potato protein by enzymatic hydrolysis under high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 482–489, 2020.

NETO, O. C. *et al.* Effects of Hydrostatic Pressure Processing on Texture and Color of Zebu Beef. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 4, p. 837–843, 2015.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2018. v. 410, n. 15, p. 3407–3423.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308–319, 2015.

PEÑAS, E. *et al.* Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 831–839, 2006b.

\_\_\_\_\_; *et al.* Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 3–4, p. 286–290, 2006a.

\_\_\_\_\_; *et al.* High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 969–975, 2006c.

\_\_\_\_\_; PRÉSTAMO, G.; GOMEZ, R. High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. **Food Chemistry**, 2004. v. 85, n. 4, p. 641–648.

PERREAULT, V. *et al.* Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1805–1812, 2017.

POTTIER, L.; VILLAMONTE, G.; LAMBALLERIE, M. Applications of high pressure for healthier foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 21–27, 2017.

POWER-GRANT, O. *et al.* In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: Targeting the enteroinsular axis. **Food and Function**, v. 6, n. 3, p. 972–980, 2015.

\_\_\_\_\_; *et al.* Evaluation of the antioxidant capacity of a milk protein matrix in vitro and in vivo in women aged 50-70 years. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 325–334, 2016.

PREMKUMAR, J.; MALINI, M.; ARUN JOSHY, V. A critical review on food protein derived antihypertensive peptides. **Drug Invention Today**, v. 12, n. 3, p. 474–479, 2019.

QIN, Z. *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical and functional properties of walnut (*Juglans regia* L.) protein isolate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 5, p. 1105–1111, 2012.

QUIRÓS, A. *et al.* The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1734–1739, 2007.

RAHAMAN, T.; VASILJEVIC, T.; RAMCHANDRAN, L. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. **Trends in Food Science and Technology**, v. 49, p. 24–34, 2016.

RASTOGI, N. K. *et al.* Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 69–112, 2007.

RODRIGUES, F. M. *et al.* Alternatives to reduce sodium in processed foods and the potential of high pressure technology. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 1–8, 2016.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A Review. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1515–1522, 2010.

SANTOS, L. M. R. *et al.* Application and possible benefits of high hydrostatic pressure or high-pressure homogenization on beer processing: A review. **Food Science and Technology International**, v. 23, n. 7, p. 561–581, 2017.

SCHOKKER, E. P.; SINGH, H.; CREAMER, L. K. Heat-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin A and B with  $\alpha$ -lactalbumin. **International Dairy Journal**, v.10 p. 843–853, 2000.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A. Food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 116–125, 2010.

SINGH, A.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 269–279, 2014.

SMITH, T. J.; FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. Sensory and Functionality Differences of Whey Protein Isolate Bleached by Hydrogen or Benzoyl Peroxide C: Food Chemistry. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 10, p. 2153–2160, 2015.

SOLÉ, D. *et al.* Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018 - Parte 2 - Diagnóstico, tratamento e prevenção. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 2, n. 1, p. 7–38, 2018.

SOMKUTI, J.; SMELLER, L. High pressure effects on allergen food proteins. **Biophysical Chemistry**, v. 183, p. 19–29, 2013.

SUN, M. *et al.* Digestibility and structural properties of thermal and high hydrostatic pressure treated sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) protein. **Plant foods for human nutrition**, v. 69, n. 3, p. 270–275, 2014.

TADESSE, S. A.; EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, v. 6, n. 8, 2020.

TAVARES, T. *et al.* Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes.

**Peptides**, v. 32, n. 5, p. 1013–1019, 2011.

TAVARES, T. G. *et al.* Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journa of Food Engineerin**, v. 110, p. 547–552, 2012.

TOLDRÀ, M. *et al.* Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 435–442, 2011.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

\_\_\_\_\_; MOHAN, A. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 45–52, 2014.

VILELA, R. M. *et al.* High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1013–1029, 2006.

VILLA, C. *et al.* Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 137–164, 2018.

XI, J.; HE, M. High hydrostatic pressure (HHP) effects on antigenicity and structural properties of soybean  $\beta$ -conglycinin. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 630–637, 2018.

YADAV, D. N. *et al.* Development of protein fortified mango based ready-to-serve beverage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3844–3852, 2016.

YADAV, J. S. S. *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/ nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

YALÇIN, A. S. Emerging Therapeutic Potential of Whey Proteins and Peptides. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 13, p. 1637–1643, 2006.

YAMAMOTO, K. Food processing by high hydrostatic pressure. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 672–679, 2017.

YANG, J.; POWERS, J. R. **Effects of high pressure on food proteins**. [S.l.]: [s.n.], 2016.

YIN, S. W. *et al.* Functional properties and in vitro trypsin digestibility of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein isolate: Effect of high-pressure treatment. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 938–945, 2008.

YOO, H. *et al.* High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Treatment Improves Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of Phosvitin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 158–167, 2017.

ZEECE, M.; HUPPERTZ, T.; KELLY, A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 62–69, 2008.

ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, n. July, p. 92–101, 2017.

ZHANG, T. *et al.* Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 904–912, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Review: Seafood Allergy and Potential Application of High Hydrostatic Pressure to Reduce Seafood Allergenicity. **International Journal of Food Engineering**, p. 1–12, 2019.

ZHAO, C.; ASHAOLU, T. J. Bioactivity and safety of whey peptides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 134, p. 109935, 2020.

ZHAO, R. J. *et al.* Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes in vitro from

mushroom foot protein. **Food Chemistry**, v. 231, p. 25–32, 2017.

ZHOU, H. *et al.* Effects of enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing on the hydrolysis and allergenicity of proteins from ginkgo seeds. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 5, p. 839–848, 2016.

ZHOU, Z.; CHENG, C.; LI, Y. Structure-based design and optimization of antihypertensive peptides to obtain high inhibitory potency against both renin and angiotensin I-converting enzyme. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 26, n. 12, p. 1001–1016, 2015.

## **CAPÍTULO II**

**EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE ANTIOXIDANT  
CAPACITY AND PEPTIC HYDROLYSIS OF WHEY PROTEINS**

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA HIDRÓLISE PÉPTICA DAS  
PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E NA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

**Artigo publicado no periódico Ciência Rural**

**Effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant capacity and peptic hydrolysis of whey proteins**  
**Efeito da alta pressão hidrostática na hidrólise péptica das proteínas do soro de leite e na capacidade antioxidante**

Ana Paula Miguel Landim<sup>1</sup>; Davy William Hidalgo Chávez<sup>1</sup>; Jeane Santos da Rosa<sup>2</sup>; Caroline Mellinger-Silva<sup>2\*</sup>; Amauri Rosenthal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, Brasil

<sup>2</sup> Embrapa Agroindústria de Alimentos, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: caroline.mellinger@embrapa.br\_\*Corresponding author.

**ABSTRACT**

The effect of high hydrostatic pressure (HHP) application on whey protein concentrate was evaluated both before (pre-treatment - PT) and during (hydrolysis assisted - HA) hydrolysis processes. A factorial design 2<sup>2</sup> with 3 central points was used with pressure (100, 250, 400 MPa) and time (5, 20 and 35 minutes) as independent variables. The hydrolysis was evaluated and monitored by soluble protein, aromatic amino acid contents and RP-HPLC. ABTS and ORAC tests were used to evaluate the *in vitro* antioxidant capacity. The reduction of soluble protein content was approximately 20% for conventional hydrolysis and for all PT treatments up to 4 h of reaction, while HHP assisted hydrolysis at 100 MPa showed a 35% protein reduction after 35 minutes of reaction. In addition, pressurization favored peptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by up to 98% and also improved the *in vitro* antioxidant capacity of the hydrolysates, which increased from 34.25 to 60.89  $\mu$ moles TE g<sup>-1</sup> of protein in the best treatment. The results suggest that the use of HHP assisted hydrolysis favored the peptic hydrolysis, with a reduction in hydrolysis time and increased antioxidant activity.

**Key words:** Enzymatic hydrolysis, Pepsin, High hydrostatic pressure, Antioxidant capacity

**RESUMO**

Neste estudo, o efeito da aplicação de alta pressão hidrostática (HHP) sobre o concentrado proteico de soro de leite foi avaliado antes (pré-tratamento - PT) e durante os processos de hidrólise (assistida por hidrólise - HA). Utilizou-se o delineamento fatorial 2<sup>2</sup> com três pontos centrais, onde as variáveis independentes foram pressão (100, 250, 400 MPa) e tempo (5, 20 e 35 minutos). A hidrólise foi avaliada pelo conteúdo de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos, além do perfil peptídico por RP-HPLC. As análises de ABTS e ORAC foram utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro*. A redução do teor de proteína solúvel foi de aproximadamente 20% para a hidrólise convencional e para todos os pontos de PT até 4h de reação, enquanto a hidrólise assistida por HHP a 100 MPa mostrou uma redução de 35% de proteína em 35 minutos de reação. Além disso, a pressurização favoreceu a hidrólise péptica da  $\beta$ -lactoglobulina em até 98% e também melhorou a capacidade antioxidante *in vitro* dos hidrolisados, que aumentaram de 34,25 para 60,89  $\mu$ moles de TE g<sup>-1</sup> de proteína no melhor tratamento. Os resultados sugerem que o uso da hidrólise assistida por HHP favoreceu a hidrólise péptica, com redução no tempo de hidrólise e aumento da atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Hidrólise enzimática, Pepsina, Alta pressão hidrostática, Capacidade antioxidante

## 1 INTRODUCTION

Whey and its derivatives are the main co-products of the dairy industry, and it contains about 55% of milk nutrients, and makes up approximately 85-95% of the total milk volume, while whey proteins account for approximately 20% of total milk protein. They are mainly composed of  $\beta$ -lactoglobulin (55-60%) and  $\alpha$ -lactalbumin (15-20%) and, to a lesser extent, immunoglobulins (Igs), bovine serum albumin (BSA), lactoferrin (LF), lactoperoxidase (LP), and peptone protease (PP) (YADAV et al., 2015).

Protein hydrolysates obtained from whey are widely used as food ingredients due to their high nutritional value. Moreover, they have improved bioactive properties, such as antioxidant, antihypertensive, antitumor, and antibacterial actions, among others (BRANDELLI et al., 2015; MARSHALL, 2004) and the study of these properties are important for adding value to the product and directly influencing consumers' choice (CHEISON & KULOZIK, 2017).

However, it is difficult to achieve a high degree of hydrolysis of whey proteins through the use of a single enzyme, especially in proteins having a globular structure and hydrophobic core, such as  $\beta$ -lactoglobulin. The specific cleavage points in the peptide chain are not accessible to the enzyme, making the hydrolysis process less efficient (ABADÍA-GARCÍA et al., 2016; TAVARES et al., 2012). The modification of the protein conformation, especially the unfolding of the protein, is an interesting strategy to improve the efficiency of the enzymatic reactions. This strategy leads to a greater exposure of cleavage points to enzymatic attack, causing the reaction to occur in a shorter time and more efficiently (AMBROSI et al., 2016).

To this effect, high hydrostatic pressure (HHP), one of the most sustainable and ecological technologies for food technology, has been specially studied with the purpose of inducing structural and conformational changes in proteins. It has a considerable effect on the mobilization of weak bonds, such as hydrogen bonds and electrostatic interactions, promoting unfolding of tertiary and secondary structures and leading to protein denaturation (MARCINIAK et al., 2018b; MUNIR et al., 2019). In addition, proteins that have globular conformation, such as whey proteins, are more likely to be altered by the use of HHP. Among whey proteins,  $\beta$ -lactoglobulin presents higher barosensitivity when compared to  $\beta$ -lactalbumin, favouring the use of HHP to unfold it (AMBROSI et al., 2016; HUPPERTZ et al., 2006; MUNIR et al., 2019). Some studies confirm the effect of high hydrostatic pressure on the enzymatic hydrolysis of whey (AMBROSI et al., 2016; GARCIA-MORA et al., 2015; LOZANO-OJALVO et al., 2017; PEÑAS et al., 2006) and in the increase of bioactive activities, such as antioxidant capacity (ISKANDAR et al., 2015; PICCOLOMINI et al., 2012)

However, in these previous studies, a multi-factorial experimental design was not used to optimize the hydrolysis process using HHP, evaluating pressure and time parameters together, as their interaction may influence on protein hydrolysis. Thus, a predictive model of the effects of these hydrolysis parameters and optimization of the conditions can be investigated, and the response surface methodology (RSM) has been described as a useful empirical tool to optimize the process of conventional hydrolysis of whey (PESSATO et al., 2016) and caseins (NONGONIERMA et al., 2016). Also, since HHP can be used in the form of a pretreatment or assisting the hydrolysis process, it is important to understand the reactions and responses of the treatments to the variation of the evaluated parameters.

Thus, in this study, the applicability of HHP treatment was evaluated, and the effect of this treatment was evaluated for the enzymatic hydrolysis and antioxidant properties of whey

protein concentrate (WPC) solutions, using the enzyme pepsin as a biocatalyst and the RSM to select the ideal conditions in which the HHP should be used.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Material

A WPC powder containing 88% protein, which was kindly donated by Alibra Ingredientes Ltda, was used as the substrate. Commercial grade swine pepsin TS was supplied by the Coal and Coagulants Factory Bela Vista Produtos Enzimáticos Ind. E Com. Ltda.

### 2.2 Preparation of Protein Hydrolysates

#### 2.2.1 Preparation of whey

For all experiments, the WPC 88 was solubilized in water at 2.5% (w/v) concentration. The enzymatic reactions were performed with 1.96% pepsin, and the enzyme catalytic activity was  $0.28 \mu\text{U mL}^{-1}$ . The pH and temperature of the solution were adjusted to the optimal range of the enzyme (pH 2 and  $37^\circ\text{C}$ ).

#### 2.2.2 Hydrolysis processes

The hydrolysis were performed in three ways: conventional (CH), using the HHP as pretreatment in the whey (PT) and assisted by HHP (AH), as follows.

*Conventional hydrolysis (CH):* In this process the whey protein resuspended (2.5% w/v) was placed in a thermostatic bath with temperature ( $37^\circ\text{C}$ ) and constant stirring (16 rpm) for 15 minutes for acclimatization. The initial sample was collected (Control - C), and the enzyme was added for hydrolysis execution. The temperature, pH, and stirring speed were monitored throughout the reaction, and samples were collected after 1 minute ( $T_0$ ), 60 minutes ( $T_{60}$ ), 120 minutes ( $T_{120}$ ), 180 minutes ( $T_{180}$ ), and 240 minutes ( $T_{240}$ ) of hydrolysis. After, the enzymatic action was immediately stopped by placing the samples in a water bath at  $80^\circ\text{C}$  for 15 minutes, followed by immediate cooling in an ice bath. All samples were freeze-dried and stored under freezing condition ( $-18^\circ\text{C}$ ) for further analysis.

*HHP pretreatment (PT):* The resuspended whey protein has been subjected to the process of high hydrostatic pressure (HHP), using different pressure and time levels for each treatment. The samples were packed in high strength polyethylene bags, vacuum sealed, and then pressurized using the high hydrostatic pressure equipment (Stanted Fluid Power and model SF-L-850-9-W). Afterwards, the pre-treated whey was hydrolysed on the same conditions treatment described in the conventional hydrolysis.

*HHP-assisted treatment (AH):* This treatment the samples containing the whey and the enzyme were packed in high strength polyethylene bags, vacuum sealed, and immediately pressurized using the high hydrostatic pressure equipment (Stanted Fluid Power and model SF-L-850-9-W) in the different pressure and time levels for each treatment. Soon after, the enzyme was inactivated as previously described in the CH.

#### 2.2.3 Experimental design

In all the experiments in which high hydrostatic pressure (HHP) was used (pretreatment or assisted), and the treatment was carried out using a set of experiments



followed the Box-Behnken Design (BOX & BEHNKEN, 1960), formed by the combination of two-level factorial experiments with incomplete block designs. Error evaluation was obtained from the replicate of the central point.

The following second-order polynomial model (1) was used to analyze the experimental data:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_1x_2 + b_4x_1^2 + b_5x_2^2 \quad (1)$$

Where,  $x_i$  ( $i = 1-2$ ) are the pressure and time variables;  $y$  are the dependent variables (soluble proteins, aromatic amino acids, antioxidant capacity); and,  $b_{i(i=1-5)}$  are the regression coefficients estimated by means of the multiple linear regression experimental data.

The different independent variables were described in Table 1.

**Table 1** - Experimental conditions of pressure and time in the hydrolysis treatments using the high hydrostatic pressure technology, according to the factorial design  $2^2$  with 3 replicates of the central point.

HHP <sup>a</sup> assisted hydrolysis (AH)			HHP <sup>a</sup> pre-treated sample (PT)		
Assay	Pressure	Time	Assay	Pressure	Time
AH1	-1 (100)	-1(5)	PT1	-1 (100)	-1(5)
AH2	1 (400)	-1 (5)	PT2	1 (400)	-1 (5)
AH3	-1 (100)	1(35)	PT3	-1 (100)	1(35)
AH4	1 (400)	1 (35)	PT4	1 (400)	1 (35)
AH5 (C)	0 (250)	0 (20)	PT5 (C)	0 (250)	0 (20)
AH6 (C)	0 (250)	0 (20)	PT6 (C)	0 (250)	0 (20)
AH7 (C)	0 (250)	0(20)	PT7 (C)	0 (250)	0(20)

<sup>a</sup>High hydrostatic pressure. Encoded values (actual values in parentheses). Unit of Real Values. Pressure in MPa and time in minutes. HHP – High hydrostatic pressure.

## 2.3 Chemical Characterization

### 2.3.1 Soluble protein content

The evolution of hydrolysis during the process was verified by the soluble protein content, evaluated according to BRADFORD (1976), in which proteins and peptides greater than 3 kDa are measured. Bovine serum albumin (BSA) was used as a protein standard.

### 2.3.2 Aromatic amino acid content

Samples were precipitated in volumes equal to 10% (w / v) trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4 ° C to remove large peptides. After, it was centrifuged at 2146.56g at 4 °C for 20 minutes. The supernatant was read in a spectrophotometer at 280 nm. Aromatic amino acid release was calculated from a tyrosine curve (GOODWIN & MORTON, 1946).

### 2.3.3 Chromatographic analysis of peptides and proteins

Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the peptide profiles generated by the hydrolysis and for the quantification of  $\alpha$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lactalbumin proteins in the hydrolyzed samples. An analytical HPLC unit from Jasco was used. For the chromatographic analysis, lyophilized samples were resuspended in water (2 mg mL<sup>-1</sup>). The pH of 5.5 was adjusted to be similar to the mobile phase, and an injection volume of 20  $\mu$ L was used. The analyses were performed with a Hypersil BDS C18 column (100x4.6mm; 2.4 $\mu$ ; Thermo, USA) with runs of 40 minutes, using

a flow of 1.0 mL/minutes, pressure of 126 bar, and temperature of 30 °C. The mobile phases used were: (A): 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure water (v/v); and (B): 0.1% TFA in acetonitrile (v/v). Detection was performed by UV at 216 nm.

## 2.4 Antioxidant Capacity

### 2.4.1 ABTS Assay

The antioxidant capacity was determined by the spectrophotometric method based on the discoloration of free radical ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) according to RE et al., (1999). The results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) in  $\mu\text{moles TE g}^{-1}$  protein.

### 2.4.2 ORAC Assay

The ORAC assay was performed according to the method described in ZULUETA et al., (2009). Fluorescein solutions, Trolox standard, and AAPH solution (2,2-Azobis, 2-methylpropionamide) dihydrochloride were prepared on the day of analysis. In a 96-well microplate, 100  $\mu\text{L}$  of the standard, 500-fold diluted sample, and a blank (75 mM Phosphate buffer pH 7.4) were added. Then, 100  $\mu\text{L}$  of the fluorescein solution was added, and the plate was placed on the microplate reader, which injected 50  $\mu\text{L}$  of the AAPH solution at 37 °C. The fluorescence reading was performed until the initial fluorescence value of 5% was reached. For the calculations, the area under the curve (AUC) of the samples was used, and the results were expressed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) in  $\mu\text{moles TE g}^{-1}$  of protein.

## 2.5 Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) with significance of 5% was performed to determinate differences among treatments, then the Tukey test was carried out for mean comparisons for at a significant level of  $P < 0.05$ .

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

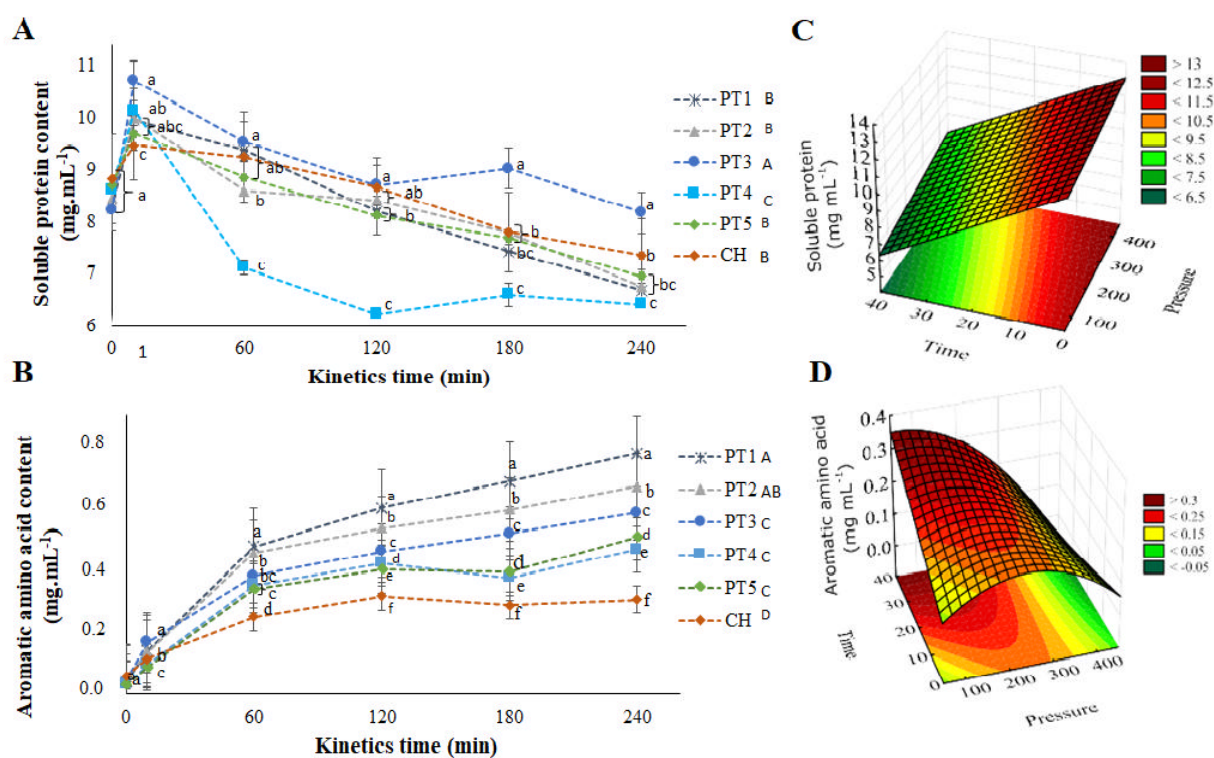
In this study, HHP was used to assist the hydrolysis process as a pre-treatment of whey (PT) or HHP-assisted hydrolysis (AH). As a control, conventional hydrolysis (CH) was performed in untreated whey at room pressure (0.1 MPa). The pressure and time used in the treatments varied according to the experimental design, exhibited in Table 1. Table 2 shows the effects of the independent variables (pressure and time) on the dependent variables (soluble proteins, aromatic amino acids, and *in vitro* antioxidant capacity).

### 3.1 Influence of HHP on the Chemical Properties of Hydrolyzed WPC

The chemical properties of the hydrolysates were evaluated for the content of soluble proteins, aromatic amino acids, and chromatographic profiles.

The content of soluble proteins was monitored for 240 minutes in the CH and PT treatments (Figure 1A). In general, the variables time and pressure were not significant ( $P > 0.05$ ) in reducing the soluble protein content when HHP was used in PT. The exception was for the time of 240 minutes of hydrolysis, in which the pressure had a negative effect ( $P <$

0.05) and time a positive effect ( $P < 0.05$ ), suggesting the use of higher pressure to obtain a greater reduction in soluble protein content (Table 2). Although in all experiments a reduction in the soluble protein content is observed, which indicates peptic hydrolysis, in the experiment in which the pressure of 400 MPa for 35 minutes (PT4) was used, the reduction of soluble proteins was 25% after 120 minutes of hydrolysis, while the reduction of soluble proteins in CH was 20% after 240 minutes, indicating that the use of HHP in this condition decreased the hydrolysis time by 50%. The PT1, PT2, and PT5 experiments showed no significant difference ( $P > 0.05$ ) in relation to CH, which can be by the structural rearrangement of proteins, resuming their structural conformation after depressurization. The time it takes for proteins to refold is entirely dependent on the level of pressure, pH, and time applied in the process (AMBROSI et al., 2016; HUPPERTZ et al., 2006; HUPPERTZ et al., 2004). After decompression of the system, the restructuring of  $\beta$ -Lg occurs quickly at acidic pH, especially when pressures below 300 MPa are used, which may justify the lack of effect of HHP on PT, suggesting the need for higher pressures for a lingering effect after the system is depressurized (BELLOQUE et al., 2007).



**Figure 1** - Whey protein hydrolysis curves after conventional hydrolysis (CH) and HHP-pretreated (PT) evaluated by (A) soluble protein content; (B) aromatic amino acid content, at the different times of process and response surface graphs for the effect of HHP on assisted hydrolysis (AH) in the different conditions of the experimental planning for (C) soluble protein content and (D) aromatic amino acid content. PT1 = 100 MPa / 5 minutes; PT2 = 400 MPa / 5 minutes; PT3 = 100 MPa / 35 minutes; PT4 = 400 MPa / 35 minutes; PT5 = 250 MPa / 20 minutes. Treatments with different lowercase letters, at similar hydrolysis times, are significantly different from each other ( $P \leq 0.05$ ). Capital letters next to the legend indicate statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) between treatments.

Figure 1B shows the values of aromatic amino acids released along the hydrolysis processes. In all treatments, the rate of release of amino acids increased throughout the hydrolysis process, but PTs experiments showed higher values than CH. Regardless, HHP showed an effect only in the 180 and 240 minutes of hydrolysis, where pressure and time had

a significant negative quadratic effect ( $P < 0.05$ ) (Table 2), which means that the use of lower pressures for a shorter time in a pre-treatment process favored the release of amino acids during hydrolysis. Thus, the highest levels of amino acids were obtained in PT1 and PT2, being significantly different ( $P < 0.05$ ) from PT3, PT4, and PT5 (Figure 1B).

In HHP-assisted hydrolysis, enzymatic reactions occur simultaneously with the application of pressure for a stipulated time. In this process, the pressure had no significant influence ( $P > 0.05$ ) on the reduction of soluble proteins, but the time was significant ( $P < 0.05$ ) (Table 2). Thus, the reduction in the soluble protein content was greater in the treatments of longer time (35 min), regardless of the applied pressure (100 or 400 MPa), as observed for AH3 and AH4, which showed a 35 and 25% reduction in soluble proteins, respectively (Figure 1C), with significant gain compared to CH, which showed a reduction of 20%. The HHP-assisted treatment was more efficient to reduce the soluble protein content in less time when compared to the CH process, which showed a 20% reduction in proteins after 240 minutes of hydrolysis. Regarding the release of aromatic amino acids (Fig. 1D), pressure and time had no significant effect ( $P > 0.05$ ), but higher levels were found in the longer, AH3 (100 MPa / 35 min) and AH5 (250 / 20 min). These findings are in line with the observations made by ZHANG et al., (2012), who found that the pressurization time was more significant in increasing the degree of hydrolysis than the pressure level. The folding changes that occur during the HHP process cause more protein cleavage sites to be exposed, and allow the enzymes present in the process to access these sites that were not previously possible, due to the compact structure of whey proteins. Also, HHP can result in enzymatic activation, which can increase catalytic power and promote a higher degree of hydrolysis (DUFOUR et al., 1995; HENDRICKX et al., 1998; MENEZES et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Figures 2A, B, and C show the peptide profiles of the hydrolysates CH, PT, and AH, respectively. In general, the peptide profiles of the hydrolysate CH (Fig. 4A) and hydrolysates PTs (Fig. 4B) were similar, although it is possible to observe a greater intensity of some peaks in the chromatograms of the experiments in which the HHP was used. Figures 2A and B show that rapid and efficient hydrolysis of  $\alpha$ -La, regardless of the time and pressure used in PT. Typically, pepsin-mediated hydrolysis is similar to promoting fast and efficient  $\alpha$ -La hydrolysis and partial  $\beta$ -Lg hydrolysis (OZORIO et al., 2019).  $\alpha$ -La is less stable in acidic pH, which makes it more prone to peptic hydrolysis. The opposite happens with native  $\beta$ -Lg, which has a compact structure in acidic pH where amino acid residues are buried inside the molecule and inaccessible to the enzyme. However, in the treatment in which a pressure of 400 MPa was used for 35 minutes (PT4), the reduction in its peak area was 76% after 180 minutes of hydrolysis, while in the CH experiment the reduction in the area of  $\beta$ -Lg was of only 29% after the same reaction period. The use of 400 MPa for 35 minutes was enough to cause changes that persisted after depressurization, facilitating the access of pepsin to specific points of this protease.

In high pressure-assisted (HA) hydrolysis of WPC (Fig. 2C), the chromatograms reinforce the observations that time was the response variable that significantly influenced the reduction of soluble proteins. In chromatograms where the pressures of 100 MPa (AH1) and 400 MPa (AH2) were applied for 5 minutes, the peak reduction for  $\alpha$ -La was 2 and 4%, and for  $\beta$ -Lg 38% and 37%, respectively. On the other hand, when the longest process time was used, regardless of whether the pressure was 100 MPa, 250 MPa, or 400 MPa, the reductions in the peak area for  $\beta$ -Lg were 98, 98, and 78%, respectively. Similar responses were observed by FRANCK et al., (2018), who showed that, in assisted hydrolysis, time was also important for the process, but emphasized that a combination of higher pressure for a longer period is ideal. However, it must be taken into account that the use of pressures above 300 MPa can cause conformational changes in the enzymes that could also result in a decreased enzyme activity (PEÑAS, et al., 2006; YOO et al., 2017; ZHANG et al., 2012).

**Table 2** - Regression coefficients and ANOVA of fitted model for antioxidant capacities (ABTS, ORAC), soluble protein and aromatic amino acid assays.

<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment WPC<sup>b</sup></b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble Protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9987; R2Adj=0.9937		R2=0.9985; R2Adj=0.9926		R2=0.9344; R2Adj=0.67176		R2=0.9344; R2Adj=0.6718	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>48.20</b>	<b>0.003</b>	<b>203.84</b>	<b>0.010</b>	<b>8.322</b>	<b>0.001</b>	<b>0.039</b>	<b>0.009</b>
(1)Pressure(L)	-1.32	0.135	<b>-52.46</b>	<b>0.046</b>	0.148	0.092	0.000	0.633
Pressure(Q)	<b>-4.66</b>	<b>0.033</b>	<b>-68.40</b>	<b>0.030</b>	0.200	0.059	-0.005	0.074
(2)Time (L)	-3.08	0.058	<b>55.29</b>	<b>0.043</b>	0.025	0.448	-0.005	0.088
1L by 2L	0.95	0.184	<b>-80.28</b>	<b>0.030</b>	0.059	0.225	-0.007	0.065
<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment (Time 1 minute of process)</b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9987; R2Adj=0.9937		R2=0.9985; R2Adj=0.9926		R2=0.9344; R2Adj=0.6718		R2=0.9778; R2Adj=0.8888	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>51.05</b>	<b>0.002</b>	<b>294.26</b>	<b>0.013</b>	<b>9.900</b>	<b>0.005</b>	<b>0.124</b>	<b>0.019</b>
(1)Pressure(L)	-0.88	0.150	<b>-100.35</b>	<b>0.046</b>	-0.141	0.376	-0.018	0.158
Pressure(Q)	<b>-3.88</b>	<b>0.030</b>	<b>-96.38</b>	<b>0.041</b>	-0.176	0.278	-0.015	0.160
(2)Time (L)	<b>-3.68</b>	<b>0.037</b>	<b>95.81</b>	<b>0.048</b>	0.212	0.267	-0.003	0.638
1L by 2L	-1.08	0.123	-57.31	0.079	-0.145	0.367	-0.016	0.174
<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment (Time 60 minutes of process)</b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9987; R2Adj=0.9937		R2=0.9985; R2Adj=0.9926		R2=0.9344; R2Adj=0.6718		R2=0.9344; R2Adj=0.6718	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>153.29</b>	<b>0.006</b>	<b>1526.6</b> <b>2</b>	<b>0.013</b>	<b>25.260</b>	<b>0.010</b>	<b>0.932</b>	<b>0.044</b>
(1)Pressure(L)	-13.15	0.078	<b>-749.63</b>	<b>0.032</b>	-2.509	0.119	-0.334	0.148
Pressure(Q)	<b>-18.03</b>	<b>0.050</b>	-165.69	0.125	-0.001	0.998	-0.004	0.965
(2)Time (L)	-5.45	0.185	456.19	0.053	-0.876	0.317	0.148	0.312
1L by 2L	1.25	0.583	-234.65	0.102	-1.130	0.254	0.290	0.170
<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment (Time 120 minutes of process)</b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9999; R2Adj=0.9996		R2=0.94227; R2Adj=0.7113		R2=0.9848; R2Adj=0.9240		R2=0.9416; R2Adj=0.7081	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>48.09</b>	<b>0.001</b>	<b>601.40</b>	<b>0.038</b>	<b>7.665</b>	<b>0.008</b>	<b>0.478</b>	<b>0.020</b>
(1)Pressure(L)	<b>-5.12</b>	<b>0.006</b>	-102.43	0.255	-0.561	0.136	-0.026	0.401
Pressure(Q)	<b>-0.98</b>	<b>0.027</b>	-10.30	0.830	-0.025	0.852	-0.028	0.337
(2)Time (L)	<b>-0.88</b>	<b>0.034</b>	82.41	0.309	-0.422	0.178	-0.062	0.185
1L by 2L	0.38	0.078	-115.68	0.229	-0.681	0.112	0.006	0.791

Continues

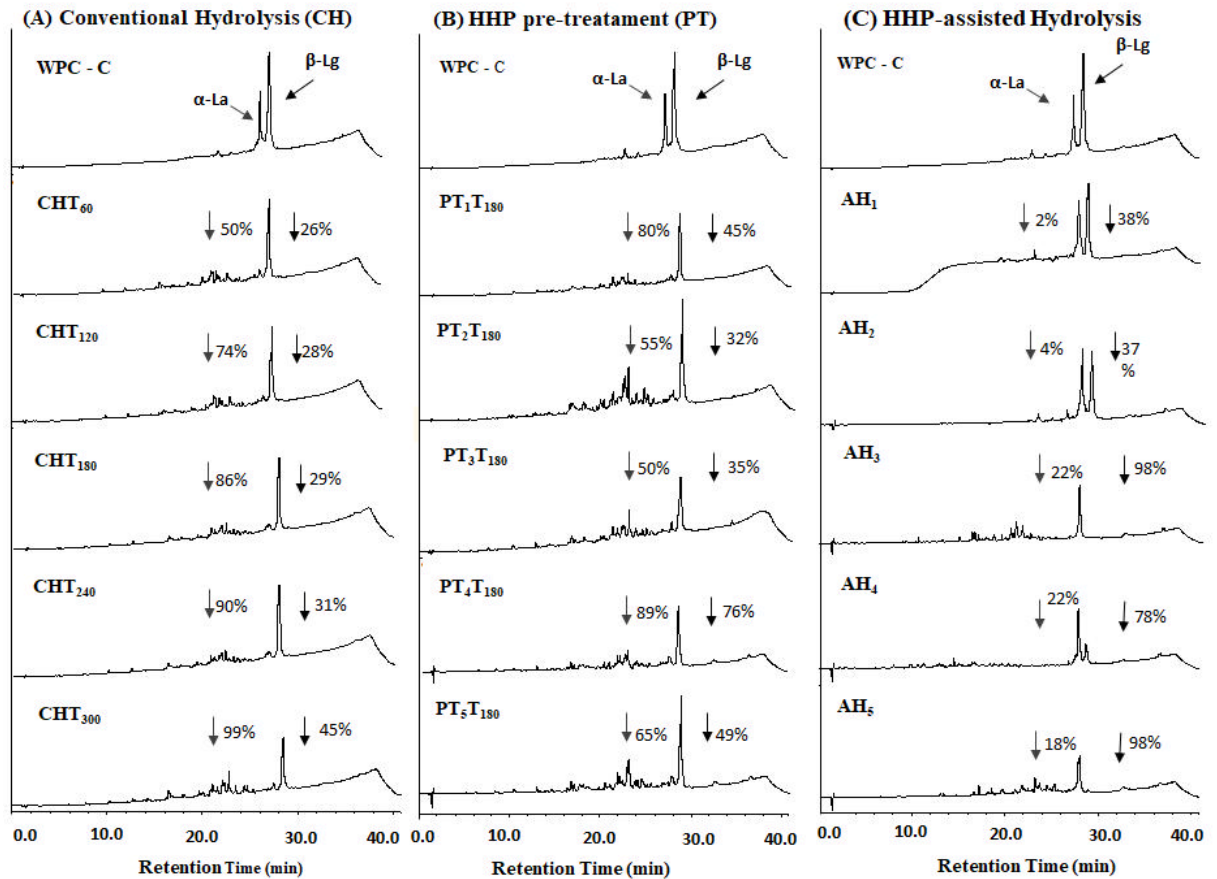
**Table 2 - Continued.**

<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment (Time 180 minutes of process)</b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9998; R2Adj=0.9989		R2=0.9999; R2Adj=0.9997		R2=0.9948; R2Adj=0.9738		R2=0.9990; R2Adj=0.9950	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>50.78</b>	<b>0.001</b>	<b>630.34</b>	<b>0.002</b>	<b>7.443</b>	<b>0.004</b>	<b>0.482</b>	<b>0.005</b>
(1)Pressure(L)	<b>-3.98</b>	<b>0.015</b>	<b>-125.93</b>	<b>0.014</b>	-0.517	0.079	-0.058	0.051
Pressure(Q)	<b>-3.44</b>	<b>0.015</b>	<b>-86.59</b>	<b>0.018</b>	-0.099	0.326	<b>-0.080</b>	<b>0.032</b>
(2)Time (L)	<b>-1.35</b>	<b>0.044</b>	<b>220.59</b>	<b>0.008</b>	0.099	0.367	<b>-0.095</b>	<b>0.031</b>
1L by 2L	<b>-2.75</b>	<b>0.022</b>	<b>-208.96</b>	<b>0.008</b>	-0.700	0.058	-0.013	0.218
<b>HHP<sup>a</sup>-pretreatment (Time 240 minutes of process)</b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9993; R2Adj=0.9962		R2=0.9956; R2Adj=0.9781		R2=0.9994; R2Adj=0.9972		R2=0.9987; R2Adj=0.9933	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>48.83</b>	<b>0.001</b>	<b>606.37</b>	<b>0.016</b>	<b>6.768</b>	<b>0.001</b>	<b>0.573</b>	<b>0.004</b>
(1)Pressure(L)	<b>-1.63</b>	<b>0.037</b>	-100.11	0.116	<b>-0.426</b>	<b>0.025</b>	-0.055	0.056
Pressure(Q)	<b>-1.68</b>	<b>0.031</b>	-55.58	0.178	-0.051	0.179	<b>-0.061</b>	<b>0.044</b>
(2)Time (L)	<b>-1.63</b>	<b>0.037</b>	179.59	0.065	<b>0.291</b>	<b>0.037</b>	<b>-0.097</b>	<b>0.032</b>
1L by 2L	<b>-1.63</b>	<b>0.037</b>	-176.08	0.067	<b>-0.458</b>	<b>0.023</b>	-0.003	0.623
<b>Assisted HHP<sup>a</sup></b>								
Term	ABTS <sup>c</sup>		ORAC <sup>d</sup>		Soluble protein		Aromatic Amino Acid	
	R2=0.9884; R2Adj:0.9425		R2=0.9936; R2Adj:0.9679		R2=0.9991; R2Adj:0.9955		R2=0.9994; R2Adj:0.9969	
	Coeff.	P	Coeff.	p	Coeff.	p	Coeff.	p
Mean/Interc.	<b>54.94</b>	<b>0.004</b>	<b>380.94</b>	<b>0.014</b>	<b>9.76</b>	<b>0.003</b>	<b>9.76</b>	<b>0.003</b>
(1)Pressure(L)	-3.20	0.089	21.46	0.286	0.51	0.079	0.51	0.079
Pressure(Q)	-1.08	0.219	40.87	0.137	-0.01	0.909	-0.01	0.909
(2)Time (L)	0.53	0.445	106.37	0.062	<b>-2.06</b>	<b>0.020</b>	<b>-2.06</b>	<b>0.020</b>
1L by 2L	2.27	0.124	49.79	0.130	0.05	0.558	0.05	0.558

<sup>a</sup>HHP – High hydrostatic pressure. <sup>b</sup>WPC – Whey protein concentrate. <sup>c</sup>ABTS assay (ABTS<sup>+</sup> - 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate). <sup>d</sup>ORAC assay (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Furthermore,  $\alpha$ -La was more susceptible to peptic hydrolysis in the PT and CH experiments, and  $\beta$ -Lg became more susceptible in the AH experiment, as previously discussed. This behavior may be related to the different barosensitivity of the proteins to treatment with HHP (AMBROSI et al., 2016). Among the proteins,  $\beta$ -Lg is the most sensitive one to pressure, as it has four disulfide bonds, while  $\alpha$ -La is the most resistant because as it has only two disulfide bonds (GOYAL et al., 2013). The fact that  $\beta$ -Lg has a higher barosensitivity makes HHP-assisted an even more interesting tool to be applied since the catalytic resistance of this protein is very high under ambient pressure conditions. Thus, the

use of 100 MPa for 35 minutes might be the best combination choice for enhancing whey hydrolysis considering the discussed chemical changes.



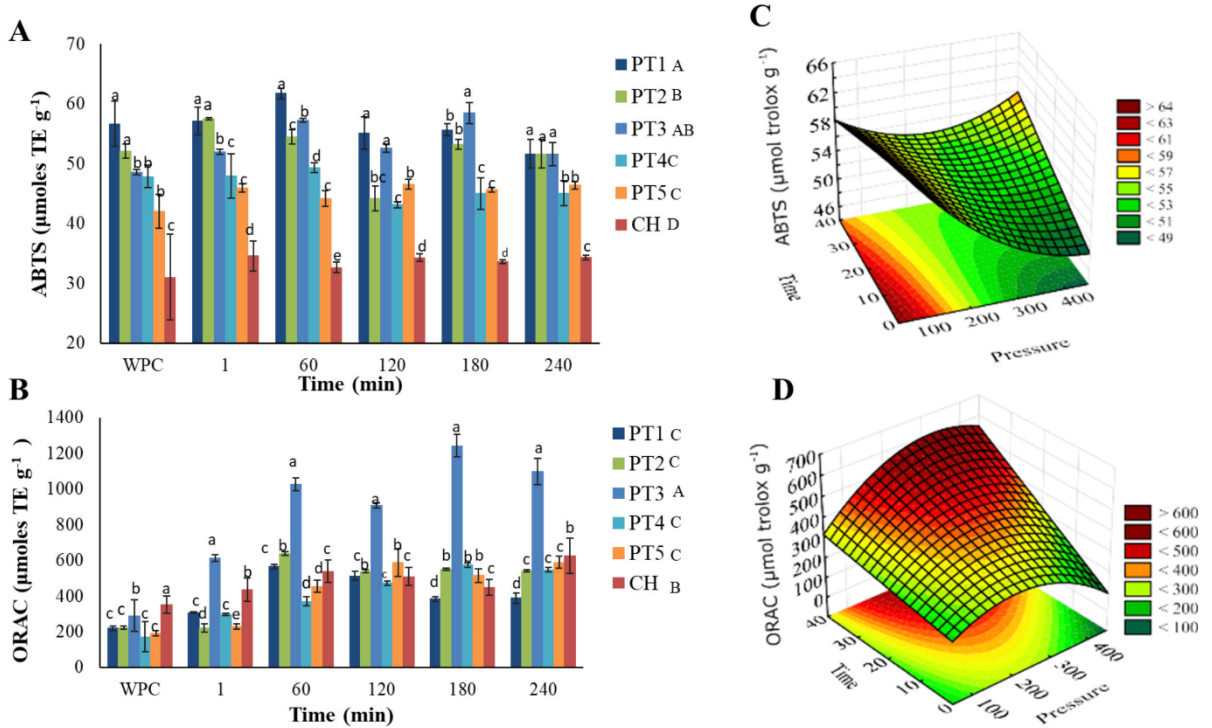
**Figure 2** - RP-HPLC chromatograms of whey protein hydrolyzed by: (A) conventional hydrolysis (CH); (B) HHP-pretreated (PT) under different experimental design conditions (PT1 to PT5) after 180 min of hydrolysis and (C) hydrolysis assisted by HHP (AH) under the different conditions of the experimental design (AH1 to AH5). The hydrolysis times of each treatment are represented by T60...T240, varying the time between 60 and 240 min, respectively.  $\alpha$ -La = alpha-lactalbumin;  $\beta$ -Lg = beta-lactoglobulin. WPC C = control. Elution time for  $\alpha$ -La = 27.8 min;  $\beta$ -Lg = 28.5 min. Down arrows indicate the % reduction in the amount of  $\alpha$ -La (left side of chromatograms) and  $\beta$ -Lg (right side of chromatograms).

### 3.2 Influence of HHP on the Antioxidant Capacity of Hydrolyzed WPC

The HHP effect used in the pre-treatment and the assisted hydrolysis on the antioxidant capacity of the hydrolysates were also evaluated using the ABTS and ORAC assays, which show the antioxidant capacity through different mechanisms of action, as ABTS that evaluates the ability of molecules to donate electrons or hydrogen, resulting in the reduction of the ABTS radical and ORAC measures the ability of antioxidants in the sample to prevent oxidative damage by breaking the chain of peroxy radicals (ZULUETA et al., 2009).

Figure 3A shows the ABTS values for the PTs and CH experiments. In the ABTS assay, peptic hydrolysis was not able to increase the antioxidant capacity of the hydrolyzate in relation to WPC. On the other hand, the use of HHP as a pre-treatment caused an increase in the antioxidant capacity in all conditions evaluated. In the pre-treatment, the pressure and time used in the process had a significant negative effect ( $P < 0.05$ ) in the different hydrolysis

times evaluated (Table 2), which suggests that the use of milder pressures and times in the pre-treatment favors a hydrolysate with greater antioxidant capacity. All PTs experiments showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) to the antioxidant capacity of the CH experiment. The highest ABTS values were obtained for pre-treated hydrolysates at the pressures of 100 and 400 MPa for 5 minutes (PT1 and PT2), and 100 MPa for 35 minutes (PT3), with 61.72, 54.45, and 57.25  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  of proteins, respectively, after 60 minutes of hydrolysis. These values represented an increase of 92% on the *in vitro* antioxidant capacity when compared to those obtained in the CH experiment.



**Figure 3** – *In vitro* Antioxidant capacity of whey protein hydrolysates after conventional hydrolysis (CH) and HHP-pretreated (PT) evaluated by (A) ABTS assay, (B) ORAC assay, at the different process time. (C) response surface graphs for the effect of HHP on assisted hydrolysis (AH) of the WPC in the different conditions of the experimental planning for ABTS, and (D) ORAC responses. PT1 = 100 MPa /5 minutes; PT2 = 400 MPa/5 minutes; PT3 = 100 MPa/ 35 minutes; PT4 = 400 MPa/35 minutes; PT5 = 250 MPa/20 minutes. Treatments with different lowercase letters, at similar hydrolysis times, are significantly different from each other ( $P \leq 0.05$ ). Capital letters next to the legend indicate statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) between treatments.

As for HHP-assisted hydrolysis, the time and pressure parameters had no significant effect ( $P > 0.05$ ) on the antioxidant capacity of the hydrolysates (Table 2). The ABTS values between treatments ranged from 52.85 to 60.59  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  of proteins (Figure 3B). These values also represent an increase of approximately 90% in the *in vitro* antioxidant capacity in relation to those verified for CH, in which the highest value observed was 34.25  $\mu\text{mol TE g}^{-1}$  after 240 minutes of hydrolysis.

These results indicate that the use of HHP as a pre-treatment (PT) or simultaneously with hydrolysis (AH) was sufficient to promote conformational changes that allowed greater interaction between chemical groups capable of promoting the donation of electrons in a



redox reaction and can act as molecules of greater antioxidant capacity, according to the ABTS assay.

In the ORAC assay, the HHP pre-treatment showed that the pressure had a significant positive quadratic effect ( $P < 0.05$ ) for all hydrolysis times, and the variable time had a significant negative linear effect ( $P < 0.05$ ) for all hydrolysis times, except 60 min (Table 2). ORAC values are shown in Figure 3B, and unlike ABTS, hydrolysis contributed to the increase in antioxidant activity. However, despite the effect of pressure and time, the pre-treatment with HHP did not increase the atom donor capacity of the hydrolysates in relation to CH, except in PT3 (100MPa / 35 min), which showed the highest activity value, 1243.53  $\mu\text{mols of TE g}^{-1}$  protein after 180 minutes of reaction. Regarding HHP-assisted hydrolysis, the levels of pressure and time used during the process did not have a significant effect ( $P > 0.05$ ) on the *in vitro* antioxidant capacity by ORAC (Table 2). The best result presented 528.77 and 477.84  $\mu\text{mols TE g}^{-1}$  protein (AH4 - 400MPa / 35 min), a value close to the control (CH - 515.13  $\mu\text{mols TE g}^{-1}$  protein), after 240 minutes of hydrolysis. However, in other studies, it was found that pressure and time can also affect these properties, especially when hydrolysis is performed simultaneously with HHP, and the use of pressures between 100 and 300 MPa might be more indicated (GARCIA-MORA et al., 2015 e ZHANG et al., 2012).

In general, the use of HHP as a pre-treatment or in an assisted form can be employed to increase the antioxidant capacity of hydrolysates. However, studying the level of pressure and time in the treatment is essential. The different levels of pressure used can affect distinctively the mechanisms of action of peptides formed during hydrolysis (GIRGIH et al., 2015). Also, the antioxidant capacity of hydrolysates has been linked to a joint action between peptides and free amino acids. HHP can promote structural changes that favor the production of peptides with antioxidant capacity, but it can also favor the increase in the release of amino acids, as observed in this study (Figure 1 B), which may be related to the increase in the antioxidant capacity of the hydrolysate pre-treated with HHP (CORROCHANO et al., 2019; ISKANDAR et al., 2015; PICCOLOMINI et al., 2012; POWER-GRANT, O. et al., 2015; VILELA et al., 2006).

Thus, evaluating only the results for the antioxidant capacity (Figure 1 A, B, C, and D), the treatment with HHP in experiments PT1 and PT3 (pre-treatment), and AH4 and AH5 (assisted hydrolysis), could be used to obtain hydrolysates with greater antioxidant capacity. However, taking into account the chemical properties (Figure 1A, B, C, and D), the most suitable treatments would be PT4 and AH3, as they presented greater antioxidant capacity and a higher degree of protein hydrolysis when compared to the CH treatment.

#### 4 CONCLUSION

According to the experimental data obtained, the present study demonstrated that HHP technology can be used to increase the hydrolysis of whey proteins when pepsin is used. In HHP hydrolysis-assisted process, time was the variable that showed significant influence in the enzymatic reaction, where the highest proteolysis with increasing *in vitro* antioxidant capacity was observed at 100 MPa for 35 minutes. Moreover, the results demonstrated that pressurizing whey proteins can unfold  $\beta$ -lactoglobulin making it more susceptible to peptic hydrolysis, and in general, it contributes to the increase in the antioxidant capacity of hydrolysates. Therefore, the use of high hydrostatic pressure in an assisted manner provided promising prospects for application in the food industry.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Brazilian agencies *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ, Grant number E-26/110.631/2012), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (EMBRAPA). The authors thank Alibra Ingredientes Ltda for supplying WPC, and Bela Vista Produtos Enzimáticos for supplying the commercial pepsin.

## DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest. The funding entities had no influence on the study design; nor in the collection, analysis or interpretation of the data; in the writing of the manuscript, nor in the decision to publish the results.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Ana Paula Miguel Landim executed all the experiments, drafted and interpreted the manuscript. Davy William Hidalgo Chávez performed and interpreted the statistical analyzes. Jeane Santos da Rosa coordinated and performed the antioxidant analysis. Caroline Mellinger-Silva designed the study and interpreted the results. Amauri Rosental supervised the study. All authors critically reviewed the manuscript and approved a final version.

## 5 REFERENCES

- ABADÍA-GARCÍA, L. et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2016. v. 37, p. 84–90.
- AMBROSI, V. et al. High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2016. v. 38, p. 294–301.
- BELLOQUE, J. et al. Unfolding and Refolding of  $\beta$ -Lactoglobulin Subjected to High Hydrostatic Pressure at Different pH Values and Temperatures and Its Influence on Proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. v. 55, n. 13, p. 5282–5288.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some New Three Level Design for Study of quantitative variables Box Behnke.pdf. **Technometrics**, 1960. v. 2, n. 4, p. 455–475.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, 2015. v. 73, p. 149–161.
- CHEISON, S. C.; KULOZIK, U. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. v. 57, n. 2, p. 418–453.
- CORROCHANO, A. R. et al. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Dairy Science**, 2019. v. 102, n. 1.
- DUFOUR, E. et al. Hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by thermolysin and pepsin under high hydrostatic pressure. **Biopolymers**, 1995. v. 35, n. 5, p. 475–483.
- FRANCK, M. et al. High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant

activity. **Food Research International**, 2018.

GARCIA-MORA, P. et al. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. **Food Chemistry**, 2015. v. 171, p. 224–232.

GIRGIH, A. T. et al. Enzymatic protein hydrolysates from high pressure-pretreated isolated pea proteins have better antioxidant properties than similar hydrolysates produced from heat pretreatment. **Food Chemistry**, 2015. v. 188, p. 510–516.

GOODWIN, T. W.; MORTON, R. A. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. **Biochemical Journal**, 1946. v. 40, n. 5–6, p. 628–632.

GOYAL, A. et al. High Pressure Processing and Its Impact on Milk Proteins: A Review. **Journal of Dairy Science and Technology**, 2013. v. 2, n. 1, p. 2319–3409.

HENDRICKX, M. et al. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. **Trends in Food Science & Technology**, 1998. v. 9, p. 197–203.

HUPPERTZ, T. et al. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006. v. 1764, p. 593–598.

HUPPERTZ, T. et al. High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. **Journal of Dairy Research**, 2004. v. 71, p. 489–495.

ISKANDAR, M. M. et al. High Hydrostatic Pressure Pretreatment of Whey Protein Isolates Improves Their Digestibility and Antioxidant Capacity. **Foods**, 2015. v. 4, n. 2, p. 184–207.

LOZANO-OJALVO, D. et al. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017. v. 43, n. February, p. 154–162.

MARCINIAK, A. et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. **Trends in Food Science and Technology**, 2018. v. 80, n. July, p. 187–198.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, 2004. v. 9, n. 2, p. 136–156.

MENEZES, E. M. D. S. et al. Efeito da alta pressão hidrostática na atividade de enzimas da polpa de açaí. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2008. v. 28, p. 14–19.

MUNIR, M. et al. Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems — A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2019. v. 57, p. 102192.

NONGONIERMA, A. B. et al. Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016. v. 97, n. 4, p. 1093–1101.

OZORIO, L. et al. Whey hydrolysate-based ingredient with dual functionality: From production to consumer's evaluation. **Food Research International**, 2019. v. 122, p. 123–128.

PEÑAS, E. et al. Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. **International Dairy Journal**, 2006. v. 16, p. 831–839.

PESSATO, T. B. et al. Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. **Food Research International**, 2016. v. 83, p. 112–120.

PICCOLOMINI, A. F. et al. High hydrostatic pressure pre-treatment of whey proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. **Food & Nutrition Research**, 2012. v. 56, p. 63–69.

POWER-GRANT, O. et al. In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: Targeting the enteroinsular axis. **Food and Function**, 2015. v. 6, n.

3, p. 972–980.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 1999. v. 26, n. 98, p. 1231–1237.

TAVARES, T. G. et al. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journa of Food Engineerin**, 2012. v. 110, p. 547–552.

VILELA, R. M. et al. High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2006. v. 50, n. 11, p. 1013–1029.

YADAV, J. S. S. et al. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/ nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, 2015. v. 33, n. 6, p. 756–774.

YOO, H. et al. High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Treatment Improves Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of Phosvitin. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2017. v. 18, n. 2, p. 158–167.

ZHANG, T. et al. Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. **Food Chemistry**, 2012. v. 135, n. 3, p. 904–912.

ZHENG, H. et al. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. **International Dairy Journal**, 2008. v. 23, n. 1, p. 69–82.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, 2009. v. 114, n. 1, p. 310–316.

### **CAPÍTULO III**

**APPLICATION OF PRELIMINARY HIGH-PRESSURE PROCESSING FOR  
IMPROVING BIOACTIVE CHARACTERISTICS AND REDUCING  
ANTIGENICITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES**

**APLICAÇÃO DE PROCESSAMENTO DE ALTA PRESSÃO PRELIMINAR  
PARA MELHORAR AS CARACTERÍSTICAS BIOATIVAS E REDUZIR A  
ANTIGENICIDADE DE HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE**

## Application of preliminary high-pressure processing for improving bioactive characteristics and reducing antigenicity of whey protein hydrolysates

Ana Paula Miguel Landim<sup>1</sup>, Natália Kimie Matsubara<sup>2</sup>, José Eduardo da Silva-Santos<sup>2</sup>,  
Caroline Grassi Mellinger<sup>3\*</sup>, Amauri Rosenthal<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, 23890-000, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Cardiovascular, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 23020-470, Brasil.

\*Corresponding author:

Avenida das Américas, 29.501 Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Tel.: +55 21 3622 9622; Fax: +55 21 3622 9713.

e-mail: caroline.mellinger@embrapa.br

### ABSTRACT

This study investigated the use of Novo Pro-D<sup>®</sup> (NPD) and ficin (FC) as alternative proteases for the production of bioactive peptides with reduced allergenicity from whey protein concentrate (WPC). In addition, the use of high hydrostatic pressure processing as pre-treatment of WPC and its impact on the final characteristics of hydrolysates were also evaluated. NPD treatments generated hydrolysates with a 98% reduction of soluble proteins, greater *in vitro* antioxidant capacity, and less immunoreactivity when compared to FC ones. However, pre-treatment was an essential tool to improve WPC hydrolysis when FC was used, resulting in hydrolysates with less soluble proteins, enhanced antioxidant capacity, and less allergenicity compared with conventional hydrolysis. As for NPD, the pre-treatment of WPC improved the *in vitro* antioxidant capacity and resulted in a 100% reduction in immunoreactivity to  $\beta$ -lactoglobulin in a shorter processing time. Importantly, bioactive peptides generated by FC displayed an improved ability to induce *in vitro* arterial relaxation, compared with those obtained from NPD process. Therefore, this study provides innovative evidence regarding how the proteases used for production of whey hydrolysates can improve its biological effects, and discloses the use of high hydrostatic pressure combined with enzymatic hydrolysis as a promising alternative to produce hydrolysates with improved properties.

**Keywords:** enzymatic hydrolysis; *in vitro* antioxidant capacity; *in vitro* allergenicity, vasodilation, whey protein hydrolysates.

### 1 INTRODUCTION

Whey is a co-product of the dairy industry that contains high protein content, of which the  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin stand out quantitatively. Whey protein isolate (WPI) and whey protein concentrate (WPC) are already widely used by the food industry. However, with the growing demand for proteins worldwide, the inclusion of whey proteins in human food will become even more necessary (Jeewanthi et al., 2015; Kilara and Vaghela, 2018).

The technological, nutritional, and functional properties of WPC and WPI are well known. The hydrolysis of these proteins through enzymatic processes is an effective process

for improving the digestibility, functionality and bioactive properties of proteins (Brandelli et al., 2015; Yadav et al., 2015). However, whey proteins might be resistant to proteolysis due to their globular structure (Dupont and Tomé, 2019). A strategy to increase hydrolysis efficiency is to cause conformational changes, such as the protein unfolding that expose cleavage points susceptible to enzymatic action previously unavailable. Many studies have evaluated the use of different technologies to induce conformational changes in proteins, including high hydrostatic pressure (HHP) (Huppertz et al., 2004, 2006). HHP pre-treatment of proteins, followed by hydrolysis, can improve protein digestibility (Belloque et al., 2007; Franck et al., 2019; Munir et al., 2019; Piccolomini et al., 2012), favor the increase in the production of bioactive peptides with anti-hypertensive properties (Chao et al., 2013; Garcia-Mora et al., 2015), increase the antioxidant capacity of them (Franck et al., 2019; Garcia-Mora et al., 2016; Iskandar et al., 2015) and contribute to the reduction of allergenicity (Belloque et al., 2007; Peñas et al., 2006).

However, the protease choice and the process parameters are fundamental to obtain hydrolysates with improved properties. According to Mazorra-Manzano et al., (2018), the most studied proteases for protein hydrolysis and production of bioactive peptides are the ones from microbial origin, such as Alcalase, Flavorzyme, Neutrase, Promatex, and those of animal origin, such as porcine pepsin, trypsin, and chymotrypsin. The wide variety of commercial proteases with unique catalytic characteristics of specificity and stability opens new perspectives for improving hydrolytic processes (Marciniak et al., 2018).

Novo Pro-D® is a microbial protease produced by genetically modified *B. licheniformis*. It is a subtilisin classified as a serine endoprotease, which acts by hydrolyzing the internal peptide bonds. Despite presenting a great potential, few reports in the literature evaluate its efficiency on proteins' hydrolysis (Antunes Lopes et al., 2020; Da Rosa et al., 2018; Maluf et al., 2020).

Ficin is a protease of plant origin, naturally presented in the latex of fig-trees, classified as a cysteine-protease, with a broad spectrum of cleavage. It hydrolyzes peptide bonds involving uncharged, aromatic, and hydrophobic amino acids (Azarkan et al., 2011; Di Pierro et al., 2014). The industry's use of plant proteins is still incipient, and among the most studied vegetable proteases are papain and bromelain (Devaraj et al., 2008; Di Pierro et al., 2014; Mazorra-Manzano et al., 2018).

Therefore, the objective of this investigation was to evaluate the use of the Novo Pro-D® and Ficin on the enzymatic hydrolysis of whey proteins, pretreated or not by HHP and to evaluate the chemical characteristics, bioactive properties and the *in vitro* allergenicity of hydrolysates.

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Materials

Bovine whey protein concentrate with 88% of protein (WPC) was donated by Alibra Ingredientes Ltda (Campinas, SP, Brazil) and was used as substrate for the study. Novo Pro-D® (NPD) was donated by Novozymes Latin America Ltda (Paraná, Brazil), and ficin (FC) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A commercial ELISA kit was used to determine the concentration of  $\beta$ -Lg immunoreactivity (R-Biopharm AG, RIDACREEN b-lactoglobulin R4901, Darmstadt, Germany). All the other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

## **2.2. Hydrolysis process**

WPC was solubilized in distilled water (2.5%, w/v) was placed in a thermostat bath (Solab, SL-152, Piracicaba, Brazil) with temperature adjusted to the optimum of NPD (50 °C) and FC (37 °C) and kept at pH 9 and 7, respectively (Da Rosa et al., 2018; Esmailpour et al., 2017). Hydrolysis was carried out at atmospheric pressure (0.1 MPa). To determine the best enzyme: substrate (E:S) ratio, concentrations of 7, 5, 3, 1% of the enzyme were used for NPD and 10, 7, and 5% for FC. Temperature, pH, and stirring speed were monitored throughout the reaction. Aliquots were collected at different times. All hydrolysates were inactivated by adding 1M HCl until reaching pH 2.0 and, then, were frozen/lyophilized for further analysis. All experiments were carried out in triplicate.

## **2.3 HHP pre-treatment**

HHP pre-treatments were carried out under optimized conditions, previously established with conventional hydrolysis processes. The WPC solutions (2,5%) were packed in high-strength polyethylene bags, vacuum-sealed, and pressurized using high hydrostatic pressure equipment (Stansted Fluid Power, model SF-L-850-9-W, Harlow, United Kingdom). Different pressure levels (100, 250, and 400 MPa) and time (5, 20, and 35 minutes) were used in the pre-treatments. The samples were then immediately submitted to hydrolysis, using the enzyme: substrate ratio of 1% for NPD and 7% for FC.

## **2.4. Chemical characterization of hydrolysates**

### **2.4.1 Soluble protein content**

The evolution of hydrolysis during the process was verified by the soluble protein content, evaluated according to Bradford (1976), in which proteins and peptides greater than 3 kDa are measured in a digital spectrophotometer (Biospectro, model SP-220, Curitiba, Brazil) at 595 nm. Bovine serum albumin (BSA) was used as a protein standard.

### **2.4.2 Aromatic amino acid content**

Samples were precipitated in an equal volume of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) overnight at 4 °C to remove large peptides. After that, the samples were centrifuged (Thermo Fisher Scientific, model Sorvall Legend R8, Massachusetts, USA) at 2146.56 g, 4 °C for 20 minutes. The supernatant was read in a spectrophotometer (Micronal, model AJX-3000PC, São Paulo, Brazil) at 280 nm. The aromatic amino acid release was calculated from a standard tyrosine curve (Goodwin and Morton, 1946).

### **2.4.3 Chromatographic analysis of proteins and peptides**

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used to analyze the peptide profiles generated by the hydrolysis and for the quantification of  $\alpha$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lactalbumin in the hydrolyzed samples. An analytical HPLC unit from Jasco (Jasco Corporation, CO2065 plus, Tokyo, Japan) was used. For the chromatographic analysis, lyophilized samples were resuspended in water (2 mg mL<sup>-1</sup>). The pH was adjusted to 5.5 in order to be similar to the mobile phase, and an injection volume of 20  $\mu$ L was used. The analyses were performed with a Hypersil BDS C18 column (100x4.6mm; particle size 2.4 $\mu$ m; Thermo Scientific, USA) with runs of 40 minutes, using a flow of 1.0 mL/minute, the pressure of 126 bar, and temperature of 30 °C. The mobile phases used were: (A), 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure water (v/v); and (B), 0.1% TFA in acetonitrile (v/v).



Hydrolysates were eluted as follows: 0-2 min, 95% A; 2-15 min, 95-80% A; 15-20 min, 80-70% A; 20-25 min, 70-60% A; 25-28 min, 60-50% A; 28-32 min, 50-40% A; 32-34 min, 40-30 % A; 34-36 min, 30-20% A; 36-38 min, 20-95% A; 38-40 min, 95% A. The detection was performed by UV at 216 nm.

## **2.5 Bioactive properties**

### **2.5.1 *In vitro* Antioxidant Capacity**

The ORAC assay was performed according to the method described in Zulueta, Esteve, & Frígola, (2009). Fluorescein solutions, Trolox standard, and AAPH solution (2,2-Azobis, 2-methylpropionamide) dihydrochloride were prepared on the day of analysis. 100  $\mu$ L of the 500-fold diluted samples, the same volume of blank (75 mM phosphate buffer pH 7.4), or the standard were added in 96-well microplates. Then the samples received 100  $\mu$ L of the fluorescein solution and were placed in the microplate reader (Tecan, Infinite M200, Hillsborough, USA), which injected 50  $\mu$ L of the AAPH solution at 37 °C. The fluorescence reading was performed until 5% of the initial fluorescence was reached. The area under the curve (AUC) of the measurements obtained for each sample was used for calculations, and the results were expressed as TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) in  $\mu$ moles TE  $g^{-1}$  of protein.

### **2.5.2 Vascular Relaxation**

For these experiments, male Wistar rats (3-4 months old) provided by the vivarium of Universidade Federal de Santa Catarina, which were maintained under standard conditions ( $22 \pm 2$  °C, light/dark cycle of 12/12 h) in ventilated cages were used. All procedures were previously approved by the local Animal Ethics Committee (5371190815). The animals were euthanized by anesthetic overdose (ketamine/xylazine; over 140/20 mg  $kg^{-1}$ , intraperitoneally), and the thoracic aortas were collected and prepared for functional experiments in organ baths containing physiological saline solution (composition in mmol L<sup>-1</sup>: NaCl 131.3, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.17, NaHCO<sub>3</sub> 14.9, D-glucose 5.5, CaCl<sub>2</sub> 1.6, EDTA 0.08; pH 7.4) at 37 °C and continuously aerated with 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>, as previously detailed (Mellinger-Silva et al., 2015). Briefly, the preparations were subjected to a basal tone of 1 g and allowed to stabilize into the organ baths for 1 h without addition of any drug. Then, endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings were stimulated by 1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> phenylephrine, a selective agonist of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. After the achievement of stable contractile responses, cumulative concentrations of the hydrolyzed (1, 3, 5, and 10 mg mL<sup>-1</sup>) were applied into the organ baths. All recordings were obtained by isometric transducers coupled to an acquisition system (PowerLab) and its application program (LabChart, v7.1; both from ADI, Castle Hill, Australia).

### **2.6. *In vitro* Allergenicity (ELISA)**

The *in vitro* allergenicity of the samples was determined by enzymatic immunoassay using RIDASCREEN<sup>®</sup>  $\beta$ -Lactoglobulin ELISA kit (R-Biopharm, R4901, Darmstadt, Germany). The reaction was read in Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at a wavelength of 450 nm, whose absorbances were entered in the RIDA<sup>®</sup>SOFT Win.net software (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) to perform the calculation of b-Lg concentrations. These experiments were performed in duplicates.

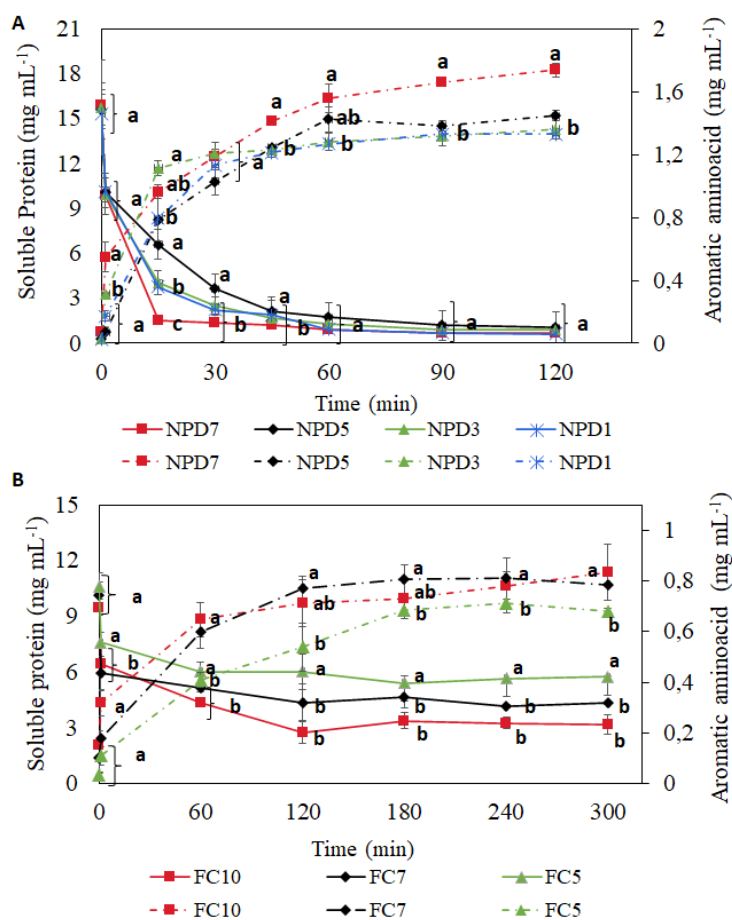
## 2.7. Statistical analysis

The results were expressed as means  $\pm$ SEM. The data obtained from soluble protein content, aromatic amino content, antioxidant capacity, and maximal relaxation induced by hydrolysates were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison test. Statistical analyses and graphs were performed using GraphPad Prism Software (version 8, San Diego, CA, USA). A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## 3 RESULT END DISCUSSION

### 3.1 Conventional hydrolysis using NPD and FC

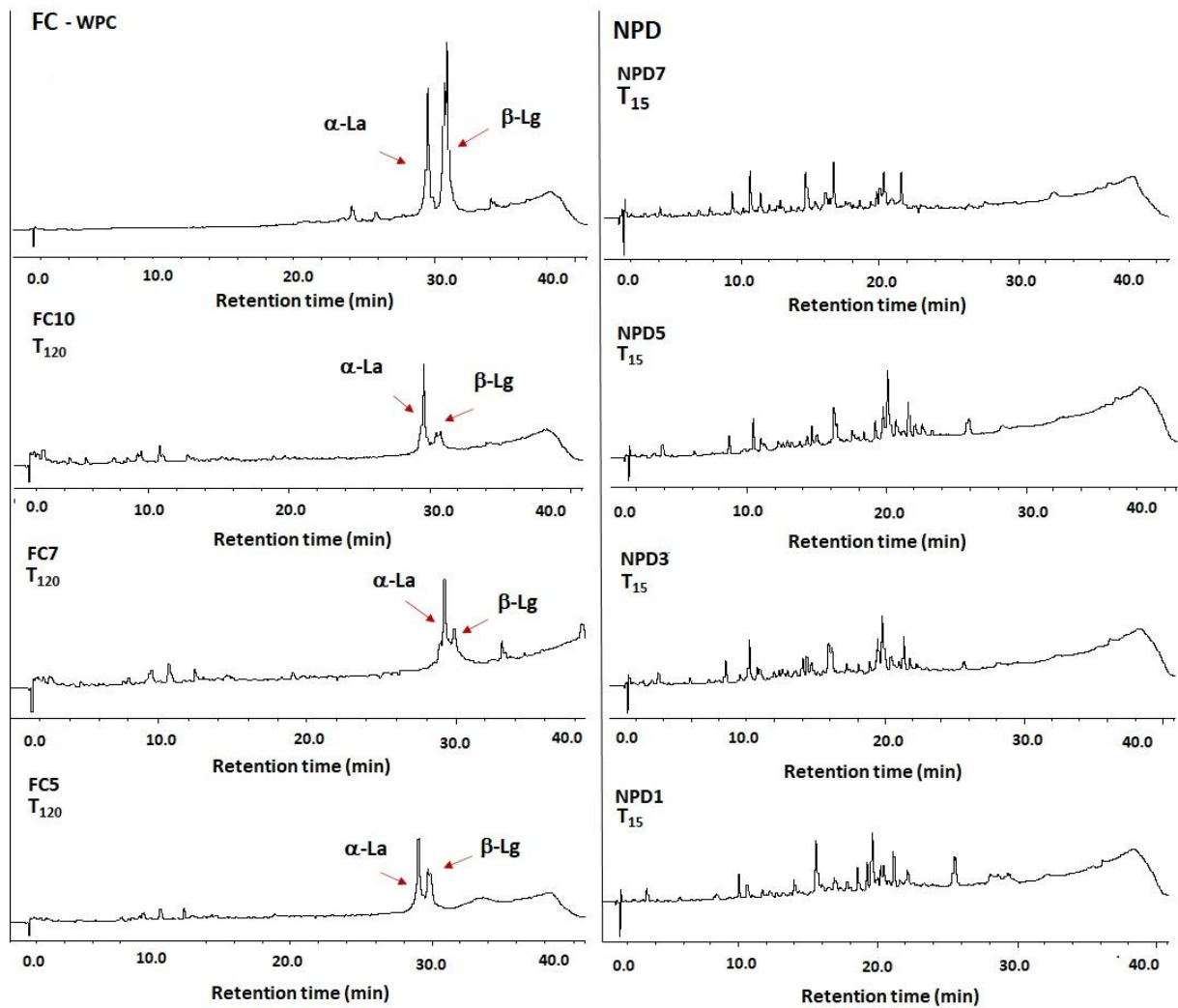
Studies that have previously used NPD or FC as proteases for the hydrolysis of whey proteins are still incipient. Therefore, a preliminary study was carried out to define the best E:S ratio and best reaction time. The chemical results were used to choose the best condition and are shown in Figure 1A e B e Figure 2.



**Figure 1.** Conventional hydrolysis regarding the content of soluble proteins (-) and aromatic amino acids (--) obtained by the treatment with Novo Pro-D® (A), Ficin (B). Treatment with the same lower case letters at the same hydrolysis time has no significant difference ( $p > 0.05$ ).

FC: Ficin. NPD: Novo Pro-D®; FC10, FC7 and FC5: concentration of 10, 7 and 5%, respectively; NPD7, NPD5, NPD3 and NPD1: concentration of 7, 5, 3 and 1%, respectively.

The treatments NPD7, NPD5, NPD3, and NPD1, using the concentrations of 7%, 5%, 3%, and 1%, respectively, did not show significant difference at the end of the hydrolysis process, either for the reduction of total soluble proteins or for the release of aromatic amino acids. The most pronounced hydrolysis occurred in the first minutes of reaction until stabilization after 60 minutes (Figure 1A). On the other hand, when FC was used, it presented a significant difference ( $p < 0.05$ ) among treatments, with a more expressive reduction in soluble proteins and greater release of aromatic amino acids for FC10 and FC7 (concentration of 10 and 7%, respectively) when compared to FC5 treatment (5% concentration) (Figure 1B). These data were confirmed by the RP-HPLC analysis, disclosing that the peptide profiles using NPD were similar to each other. In contrast, the peptide profile of the hydrolysate FC5 presented low variation and displayed a smaller reduction of the peak for b-lactoglobulin compared to FC10 and FC7 treatments (Figure 2).



**Figure 2** - Peptide profile of the hydrolysates obtained by treatment using Ficin (FC) and Novo Pro-D® (NPD).  $\alpha$ -La = alpha-lactalbumin;  $\beta$ -Lg = beta-lactoglobulin; WPC = whey protein concentrate. FC = Ficin. NPD = Novo Pro-D®; FC10, FC7 and FC5 = concentration of

10, 7 and 5%, respectively; NPD7, NPD5, NPD3 and NPD1 = = concentration of 7, 5, 3 and 1%, respectively;  $T_{120}$  = 120-minute hydrolysis time and  $T_{15}$  = 15-minute hydrolysis time.

The processing time and the enzyme-substrate ratio can be determinant for the process success, not only because they generate changes in the chemical composition of the peptides, in the bioactive properties, in the sensory quality of the product, but also because they directly reflect on the cost of the process, which tends to be more expensive with higher amounts of enzyme and longer processes (Maluf et al., 2020). Thus, the treatments NPD1 and FC7 for 120 min of reaction were selected to conduct the following experiments.

Comparing the selected treatments (NPD1 and FC7), the enzymes presented a significant difference on the ability of hydrolyzing whey proteins. NPD reduced soluble proteins by  $95.3 \pm 0.13\%$ , whereas the FC reduced it by  $56.9 \pm 1.83\%$ , after 120 minutes of the hydrolysis process. Furthermore, the peptide profiles of the hydrolysates were distinct, as NPD completely hydrolyzed  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg in the first 15 minutes of reaction, generating a wide variety of peptides, with minor changes during the process, while FC showed greater affinity for  $\beta$ -Lg as a substrate, generating a less varied peptide profile (Figure 2). Proteases have different specificities, and for this reason, they may have a greater or lesser affinity for a substrate. However, NPD is a commercial enzyme that has shown high catalytic power. Other studies have also compared the use of various proteases in the hydrolysis of WPC (Da Rosa et al., 2018), casein (Antunes Lopes et al., 2020), and porcine liver proteins (Maluf et al., 2020) and observed that NPD performed better in terms of hydrolysis efficiency.

### 3.2 Hydrolysis with HHP pre-treatments

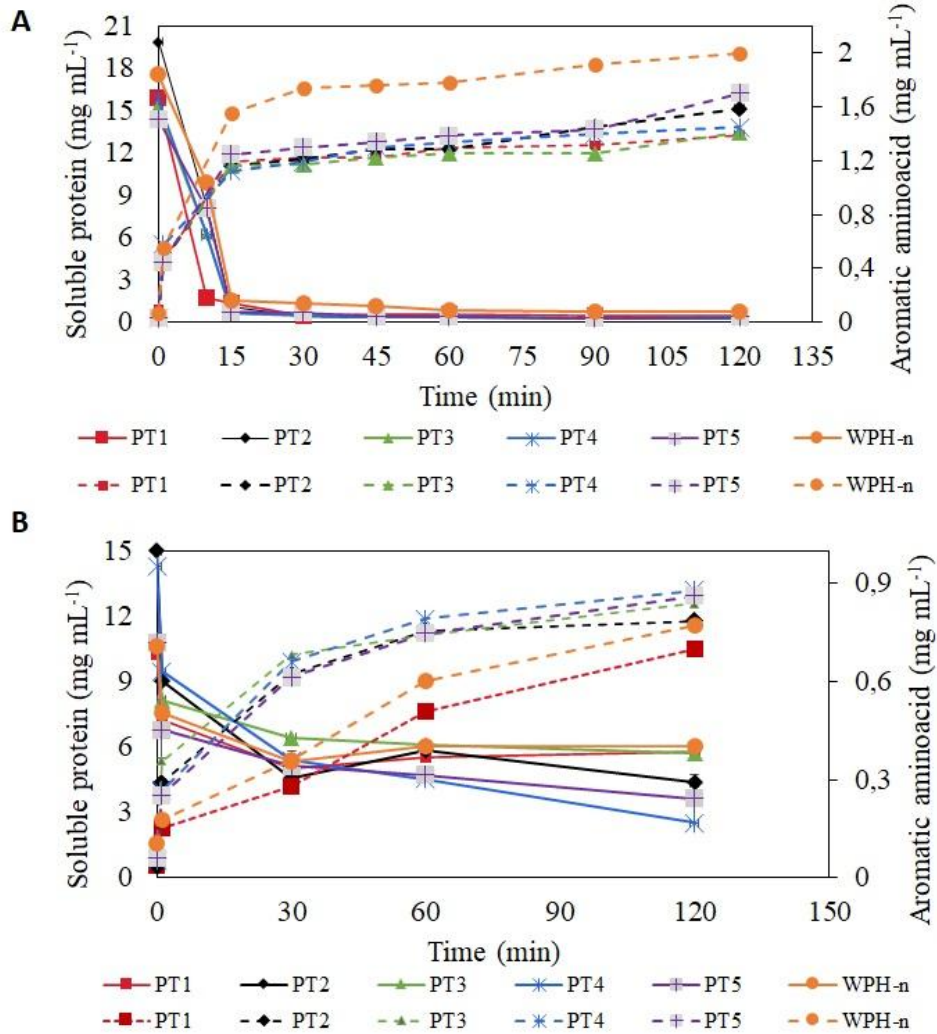
The use of HHP technology associated with hydrolysis has been extensively studied. The pressure can cause changes in the conformation of proteins and, consequently, modify the process's efficiency and the final characteristics of the hydrolysates. Thus, the pretreated WPC was hydrolyzed by both enzymes, on the previous determined conditions. The hydrolysates' chemical differences were evaluated concerning the soluble protein content, release of aromatic amino acids, and chromatographic profile, which are presented in Figure 3 A and B and Figure 4.

As expected, HHP pre-treatments (PTs) did not affect the hydrolysis of pretreated WPC when NPD was used, with soluble protein content similar to WPH-n and a significant increase in the aromatic amino acid content in the first 15 minutes of reaction in all treatments evaluated. On the other hand, in hydrolysis performed with FC, the treatments PT2 (400MPa / 5min) and PT4 (400MPa / 35min) had a more significant reduction in the soluble protein content concerning WPH-n, showing  $68.81 \pm 1.16$  and  $85.29 \pm 1.75\%$ , respectively.

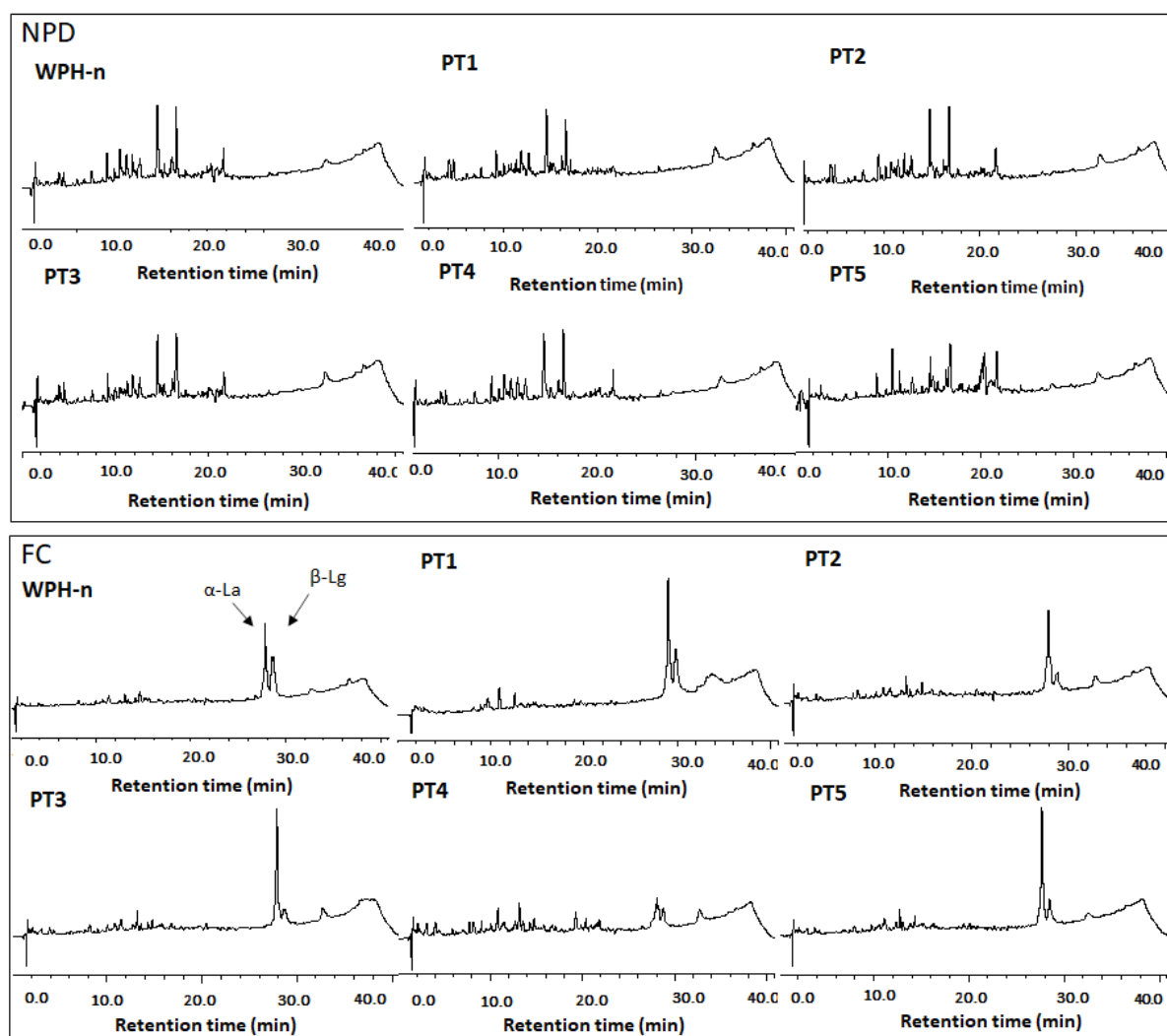
The chromatograms (Figure 4) corroborate to these findings, as the profiles of peptides remained similar in all treatments in which NPD was used, regardless of the time and pressure employed. However, in the chromatograms referring to FC, the PT4 treatment had a more expressive reduction in the area of  $\alpha$ -La and  $\beta$ -Lg peaks with a greater variety of peptides., agreeing with previous observations that the pressure of 400 MPa is most useful for whey proteins (Ambrosi et al., 2016; Boukil et al., 2018).

The effect of HHP on proteins is correlated to structural and conformational changes (Huppertz et al., 2006). Different studies mention that protein unfolding/refolding depends on the hydrolysis conditions, such as the pH, pressure level, and time employed on the process. To retard the protein refolding after depressurization, the use of pressures greater than 300 MPa for b-lactoglobulin and 500 MPa for a-lactoalbumin is more indicated (Ambrosi et al., 2016; Belloque et al., 2007; Huppertz et al., 2006; Munir et al., 2019), fact that justifies a

greater influence of HPP on ficin hydrolysis when 400 MPa was used for a longer time (35 min) (PT4).



**Figure 3** - Content of soluble proteins (-) and aromatic amino acids (-) obtained by hydrolysis of WPC pretreated by HHP using Novo Pro-D® (A); Ficin (B). WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min.



**Figure 4** - Peptide profile of the hydrolysates obtained using the Novo Pro-D® and ficin at the times of 60 and 120 min respectively, in the different pressure levels and times used in the HHP-pretreatment. WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min.

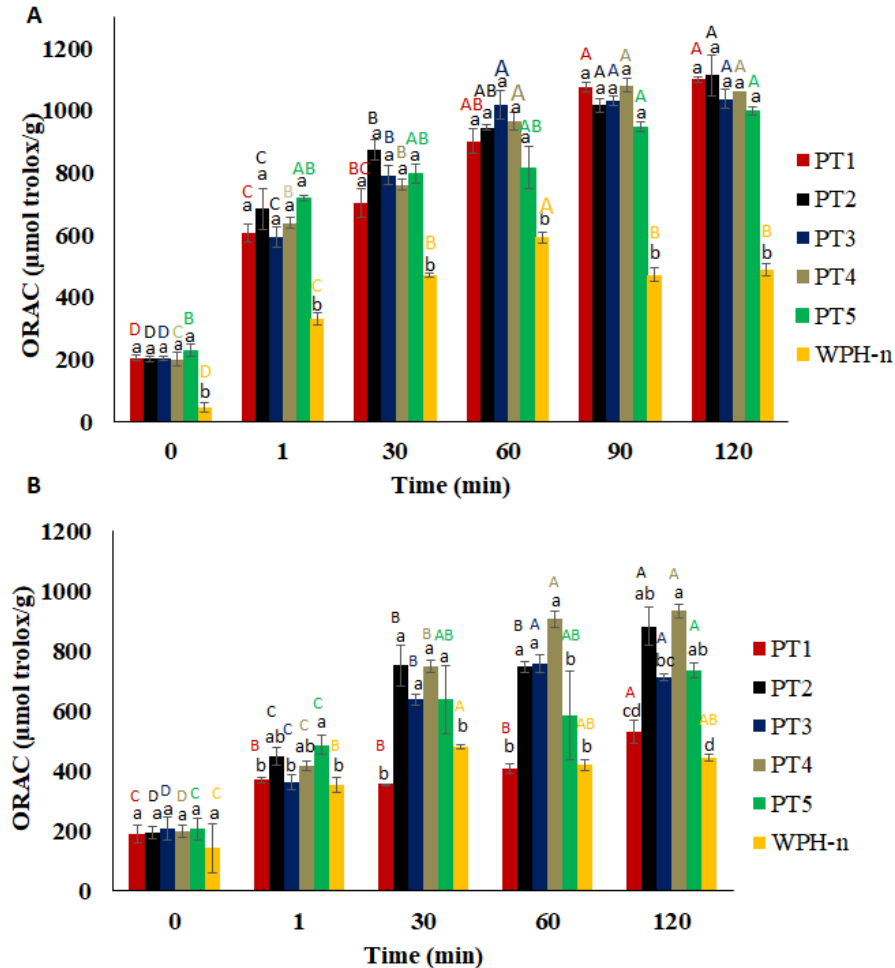
### 3.3 *In vitro* Antioxidant capacity

The antioxidant capacity of the hydrolysates obtained through the enzymatic reaction of NPD and FC in the untreated WPC (WPH-n) and in the WPC pretreated by HHP (PT) at a different time and pressure was evaluated by the ORAC test (Figure 5 A and B), which measures the ability of an antioxidant to scavenge a peroxy radical.

The conditions of enzymatic hydrolysis and pre-treatments presented a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the samples' antioxidant capacity. Comparing the different treatments, the NPD hydrolysate presented a higher antioxidant capacity when compared to the FC ones, as ORAC values were of 590 and 444 mmol TE/g of protein, for WPH-n NPD and WPH-n FC, respectively, after 60 minutes of hydrolysis.

All hydrolysates presented a considerable increase in the antioxidant capacity when comparing HHP pre-treated hydrolysis (PT) to the conventional ones (WPH-n), regardless the enzyme used. In addition, the different pressures and time levels evaluated in this study did

not show any significant difference ( $p > 0.05$ ) among NPD treatments, in which PT1, PT2, PT3, PT4, and PT5, after 120 min of reaction, presented ORAC values of  $1099.0 \pm 22.3$ ,  $1112.7 \pm 30.9$ ,  $1037.1 \pm 30.7$ ,  $1161 \pm 45.0$ , and  $997 \pm 32.3$  mmol TE/g of protein. Notably, these values were about twice the amounts observed for WPH-n NPD (Figure 5).



**Figure 5** – *In vitro* antioxidant capacity of hydrolysates by using Novo Pro-D® (A) and Ficin (B) at different times of hydrolysis. WPH-n = WPC hydrolysate not treated by HHP; PT1 = WPC pretreated at 100MPa/5min; PT2 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/5min; PT3 = WPC pretreated by HHP at 100MPa/35min; PT4 = WPC pretreated by HHP at 400MPa/35min; PT5 = WPC pretreated by HHP at 250MPa/20min. Equal lowercase letters at the same processing time indicate that there was no significant difference between treatments ( $p > 0.05$ ).

FC hydrolysates also showed an increase in the antioxidant capacity when HHP pre-treatments were applied. However, the highest values were for PT2 and PT4, with ORAC values of  $802.0 \pm 22.3$  and  $934.5 \pm 19.4$  mmol TE/g, respectively, after 120 minutes of reaction. Regardless of the use of HHP as a pre-treatment, ORAC values showed a tendency to stabilize after 60 min of reaction in all treatments, with no significant differences from the longer reaction time evaluated (120 min) (Figure 5).

More extensive protein hydrolysis can produce a higher diversity of peptide structures, especially those of low molecular weight, recognized for having a higher antioxidant capacity (Le Maux et al., 2016; Nongonierma et al., 2016) Moreover, the enzyme's selectivity can also influence the response, as the amino acid sequence of the peptides is closely linked to this

bioactivity (Maluf et al., 2020). These observations are likely to explain, at least in part, the higher antioxidant capacity for NPD hydrolysates. Also, the HHP pre-treatment promoted a significant increase in the antioxidant capacity of all hydrolysates and, although the reason is still not very clear, other studies have observed similar results in various protein matrices, as in yeast proteins (Moosavi et al., 2020), egg white protein (Singh and Ramaswamy, 2014), flaxseed protein (Perreault et al., 2017), peas protein (Girgih et al., 2015) and whey protein (Iskandar et al., 2015; Piccolomini et al., 2012).

### **3.4 In vitro Allergenicity**

*In vitro* immunoreactivity to b-Lg was evaluated in WPC and in NPD and FC hydrolysates either from HHP untreated (WPH-n) and pretreated (PT) samples. (Table 1). All hydrolyses processes were able to decrease the immunoreactivity of WPC to b-lactoglobulin. However, different enzymes and treatments using HHP (PT) produced different results. NPD and FC hydrolysates presented a reduction of 97% and 72% of WPC immunoreactivity to b-Lg, after 120 min of reaction.

NPD pre-treated samples (PT) were able to promote a 100% reduction in the WPC immunoreactivity to  $\beta$ -Lg, regardless of the pressure and time applied, after 60 min of the reaction. On the contrary, when FC pre-treated hydrolysates were tested, the highest applied pressure of 400 MPa (PT2 and PT4) resulted on more effective reduction in the immunoreactivity  $\beta$ -Lg, revealing 87% and 98% reduction, after 120 min of reaction. In this sense, HHP was able to promote structural unfolding and favored the antigenic epitopes' exposure, making them more accessible to the proteases, allowing their disruption and diminishing the antigenic response.

The evolution of hydrolysis was an essential factor for reducing WPC antigenicity, as verified in other studies (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2019; Kim et al., 2007). However, the hydrolysis process itself may not be enough to reduce the hydrolysate's antigenicity, as it depends on the reach of the catalytic site of the enzyme in more internal portions of the proteins, given their globular conformation. In this sense, the unfolding caused by pressurization on HHP processing may enhance the proteolysis and favors the reduction of whey proteins allergenicity (Abd El-Salam and El-Shibiny, 2019; Carvalho et al., 2017; Hamdy et al., 2018; Zheng et al., 2008; Zhou et al., 2016).



**Table 1** – Detection of  $\beta$ -Lg and  $\beta$ -Lg-derived peptides (ppm and % values) using the RIDASCREEN®  $\beta$ -Lactoglobulin kit in whey protein concentrate (WPC) and hydrolysates obtained by the use of FC and NPD without (WPH-n) and with HHP pre-treatments (PT) at different pressure and time levels

Hydrolysis Time (min)	NPD						FC					
	WPH-n (ppm) (%)	PT1 (ppm) (%)	PT2 (ppm) (%)	PT3 (ppm) (%)	PT4 (ppm) (%)	PT5 (ppm) (%)	WPH-n (ppm) (%)	PT1 (ppm) (%)	PT2 (ppm) (%)	PT3 (ppm) (%)	PT4 (ppm) (%)	PT5 (ppm) (%)
<b>WPC*</b>	399.0	nd	nd	nd	nd	nd	355.5	nd	nd	nd	nd	nd
<b>15</b>	155.0 61	105.3 74	57.7 86	55.7 86	15.0 96	15.9 96	161.0 52	nd	nd	nd	nd	nd
<b>60</b>	127.0 68	<1.5 100	<1.5 100	1.7 100	<1.5 100	<1.5 100	87.0 74	175.4 48	157.2 53	170.3 49	101.5 70	109.9 67
<b>120</b>	47.0 97	nd	nd	nd	nd	nd	72.5 78	93.6 72	42.2 87	79.9 76	5.2 98	58.0 83

% = percentage reduction in the immunoreactivity of hydrolysates in relation to WPC immunoreactivity, nd = Non-determined

\*WPC detection: 399.0 ppm for NPD hydrolysis and 355.5 ppm for FC hydrolysis

The PT1, PT2, PT3, PT4, and PT5 treatments correspond to the different pressure and time levels of 100MPa/5min, 400 MPa/5min, 100 MPa/35 min, 400 MPa/35 min, 200 MPa/20 min, respectively.

### 3.5 *In vitro* vascular relaxation

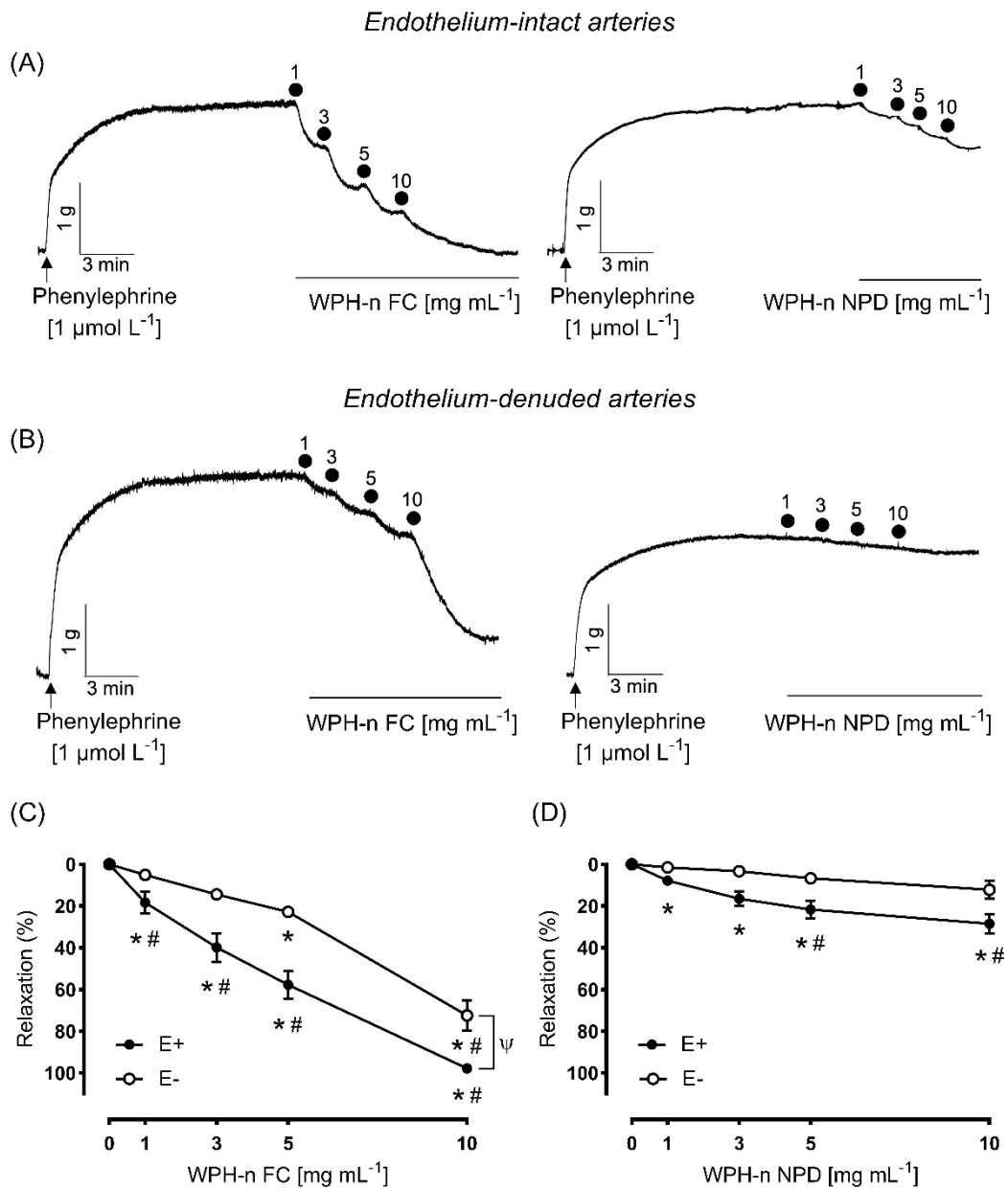
The systemic arterial pressure is dependent on vascular tone, which is regulated by both vasoconstrictors (i.e., activation of  $\alpha$ -adrenergic receptors by endogenous norepinephrine released from the sympathetic nervous system) and vasodilatory (i.e., release of nitric oxide and other relaxing factors by endothelial cells) forces. Despite the advances in the pharmacological management of cardiovascular diseases, hypertensive-related disorders are at the top of non-transmissible causes of death globally (Ritchie and Roser, 2018), reinforcing the clinical interest for alternative products with vasodilatory properties. Peptides released during enzymatic hydrolysis of the WPC have been consistently described as efficient vasodilatory agents. They may be helpful to reinforce the antihypertensive effects of classical pharmacological agents, inducing vascular relaxation throughout different mechanisms, such as inhibition of the angiotensin-converting enzyme (ACE), stimulation and increased bioavailability of nitric oxide (NO), and modulation of reactive oxygen species, among others (Chakrabarti & Wu, 2016; Mellinger-Silva et al., 2015; Ozorio et al., 2019).

To evaluate the profile of the vascular relaxation of NPD and FC hydrolysates, conventional hydrolysates (WPH-n NPD and WPH-n FC) were assayed in isolated rat aortic rings, after 60 minutes of hydrolysis for NPD and 120 minutes for FC. As illustrated by trace recordings picked from these experiments, WPH-n FC hydrolysate did generate a much more pronounced relaxation than WPH-n NPD hydrolysate in both endothelium-intact (Figure 6A) and endothelium-denuded (Figure 6B) rat aortic rings. Notably, in those preparations without functional endothelium, the cumulative concentration-response curve to WPH-n was shifted to the right, and its maximal effect was significantly decreased from  $97.7 \pm 1.8\%$  to  $72.4 \pm 7.3\%$  (Figure 6C). A similar profile was found for the WPH-n NPD hydrolysate, which had its maximal relaxation reduced from  $28.4 \pm 4.3\%$  in endothelium-intact arteries to  $12.1 \pm 4.1\%$  in endothelium-denuded arteries (Figure 6D).

We cannot state how the hydrolyses parameters may have directly influenced the achievement of vessel relaxation. Nevertheless, the optimal pH of the NPD reaction is 9, so it is necessary to add a larger NaOH volume than in the hydrolysis process carried out by FC (pH 7). This difference in the process may have led to the formation of different amounts of NaCl during the inactivation step, which was not removed from WPH-n NPD hydrolysate. The method for assessing the vascular relaxation includes the maintenance of the arteries in an environment containing controlled amounts of electrolytes, including  $\text{Na}^+$ . Thus, it is reasonable to speculate that the high amounts of NaCl putatively present in the WPH-n NPD hydrolysate may have counteracted its ability to induce vasodilation, as previously observed by Ozorio and co-workers, (2019).

The differences in the vasorelaxation induced by these hydrolysates suggest that the generation of different peptide profiles may explain, at least in part, the variety of biological properties attributed to whey hydrolysates, such as modulatory effects on the activity of the sympathetic nervous system and inhibition of the angiotensin-converting enzyme, among others (Majumder and Wu, 2015; Miralles et al., 2018; Udenigwe and Mohan, 2014).

Although NPD appeared to be less effective than FC to release peptides able to promote vascular relaxation, the WPH-n NPD hydrolysate displayed a greater antioxidant capacity, an effect that may be contributing to its endothelium-dependent vasodilatory effect. Since the antioxidant activity and endothelium-dependent and endothelium-independent effects are desired to prevent or treat cardiovascular diseases. Additional studies must be carried out to analyze the peptide profile, the biological effects of different hydrolysates, as well as the usage of different technologies accordingly with the desired effects.



**Figure 6** - Vascular relaxation induced by whey hydrolysates. Trace records of WPH-n FC and WPH-n NPD whey hydrolysates-induced vascular relaxation in endothelium-intact (A) and endothelium-denuded (B) rat aortic rings. The mean  $\pm$  SEM of vascular relaxation induced by WPH-n FC and WPH-n NPD in 5-6 preparations obtained from different animals are presented in panels C and D, respectively. Statistical analyzes were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple test. \* indicates  $p < 0.05$  compared with the basal tone; # indicates  $p < 0.05$  compared with the previous concentration in the same experimental group;  $\psi$  indicates  $p < 0.05$  compared with the E-group.

#### 4. CONCLUSION

Novo Pro-D<sup>®</sup> and ficin presented significant differences on the ability to hydrolyze the main whey proteins. NPD hydrolyzed  $\beta$ -Lg and  $\alpha$ -La within a few minutes of the process and, therefore, presented a more significant reduction of soluble proteins and greater release of aromatic amino acids when compared to FC treatments. A similar tendency was observed for the antioxidant capacity and allergenicity, in which the hydrolysates produced by the use of NPD showed a higher ORAC value and a lower amount of immunoreactivity to  $\beta$ -Lg. However, concerning the vasodilatory activity, FC's hydrolysates were more effective in inducing vascular relaxation than the ones from NPD hydrolysis.

Moreover, the use of HHP followed by enzymatic hydrolysis was an effective strategy to improve proteolysis. The changes caused by the pre-treatment of proteins with application of 400 MPa increased the accessibility of protein cleavage points to FC, contributing to further reduction of soluble proteins and release of aromatic amino acids, and also provided increased antioxidant capacity and reduction of immunoreactivity to  $\beta$ -Lg. When NPD was used, the pre-treatment also contributed to the hydrolysates' antioxidant capacity and reduced the time required to produce hydrolysates with a 100% reduction in immunoreactivity to  $\beta$ -Lg.

In summary, these results suggest that both enzymes have broad potential in whey proteolysis. However, it is reasonable to recommend that the protease choice be made according to hydrolysates' desired properties. Also, HHP can be a useful tool to increase hydrolysis rate, reducing the processing time, and improving the bioactive properties of hydrolysates.

#### 5 REFERENCES

- Abd El-Salam MH and El-Shibiny S. (2019). Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. *Food Reviews International* 276-295.
- Ambrosi V, Polenta G, Gonzalez C, et al. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 38: 294–301.
- Antunes Lopes L, Kern Novelli P, Fernandez-Lafuente R, et al. (2020). Glyoxyl-activated agarose as support for covalently link Novo-Pro D: Biocatalysts performance in the hydrolysis of casein. *Catalysts* 10(5): 6–8.
- Azarkan M, Matagne A, Wattiez R, et al. (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry* 72: 1718–1731.
- Belloque J, Chicón R and López-Fendiño R. (2007). Unfolding and refolding of b-lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different ph values and temperatures and its influence on proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(13): 5282–5288.
- Boukil A, Suwal S, Chamberland J, et al. (2018). Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated b-lactoglobulin. *Journal of Membrane Science* 556: 42–53.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–254.

- Brandelli A, Daroit DJ and Corrêa APF. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International* 73: 149–161.
- Carvalho NC de, Pessato TB, Fernandes LGR, et al. (2017). Physicochemical characteristics and antigenicity of whey protein hydrolysates obtained with and without pH control. *International Dairy Journal* 71: 24–34.
- Chakrabarti S and Wu J. (2016). Bioactive peptides on endothelial function. *Food Science and Human Wellness* 5(1): 1–7.
- Chao D, He R, Jung S, et al. (2013). Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. *Food Research International* 54(2): 1528–1534.
- Da Rosa LOL, Santana MC, Avezedo TL, et al. (2018). A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of commercial proteases. *Food Science and Technology* 38: 31–36.
- Devaraj KB, Kumar PR and Prakash V. (2008). Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from ficus carica. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry* 56: 11417–11423.
- Di Pierro G, O’Keeffe MB, Poyarkov A, et al. (2014). Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L. -derived proteinase. *Food Chemistry* 156: 305–311.
- Dupont D and Tomé D. (2019). Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. In: *Milk Proteins: From Expression to Food*: 701–714.
- Esmailpour M, Ehsani MR, Aminlari M, et al. (2017). Antimicrobial peptides derived from goat’s milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biosciences and Technology* 7(1): 65–72.
- Franck M, Perreault V, Suwal S, et al. (2019) High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. *Food Research International* 115: 467–473.
- Garcia-Mora P, Peñas E, Gomez R, et al. (2015) High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. *Food Chemistry* 171: 224–232.
- Garcia-Mora P, Peñas E, Frias J, et al. (2016). High-pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increases angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(8): 1730–1740.
- Girgih AT, Chao D, Lin L, et al. (2015). Enzymatic protein hydrolysates from high pressure-pretreated isolated pea proteins have better antioxidant properties than similar hydrolysates produced from heat pretreatment. *Food Chemistry* 188: 510–516.
- Goodwin TW and Morton RA. (1946). The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochemical Journal* 40(5–6): 628–632.
- Hamdy AM, Mohran MA, Hassan AI, et al. (2018). Effects of heat, ultrasound and microwave pretreatments on the antigenicity of whey protein concentrate ( $\beta$ -lactoglobulin). *Assiut Journal of Agricultural Sciences* 2018(49): 75–87.
- Huppertz T, Fox PF and Kelly AL. (2004). High pressure-induced denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research* 71: 489–495.
- Huppertz T, Fox PF, Kruif KG De, et al. (2006). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764: 593–598.
- Iskandar MM, Landis LC, Sabally K, et al. (2015). High hydrostatic pressure pretreatment of whey protein isolates improves their digestibility and antioxidant capacity. *Foods* 4(2): 184–207.

- Jeewanthi RKC, Lee N-K and Paik H-D. (2015). Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 35(3): 350–359.
- Kilara A and Vaghela MN. (2018). *Whey Proteins*. Second Edi. Elsevier Ltd.
- Kim SB, Ki KS, Khan MA, et al. (2007). Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. *Journal of Dairy Science* 90(9): 4043–4050.
- Le Maux S, Nongonierma AB, Barre C, et al. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry* 199: 246–251.
- Majumder K and Wu J. (2015). Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* 16(1): 256–283.
- Maluf JU, Fiorese ML, Maestre KL, et al. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering* 1–12.
- Marciniak A, Suwal S, Naderi N, et al. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science and Technology* 80: 187–198.
- Mazorra-Manzano MA, Ramírez-Suarez JC and Yada RY. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 58(13): 2147–2163.
- Mellinger-Silva C, Rosa LOL, Stephan MP, et al. (2015). Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. *International Dairy Journal* 4(48): 73–79.
- Miralles B, Amigo L and Recio I. (2018). Critical review and perspectives on food-derived antihypertensive peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(36): 9384–9390.
- Moosavi ZS, Mirdamadi S, Mizaei M, et al. (2020). Effects of ultrasonic and high-pressure homogenization pretreatment on the enzymatic hydrolysis and antioxidant activity of yeast protein hydrolysate. *Journal of Food Biosciences and Technology* 10(1): 15–26
- Munir M, Nadeem M, Qureshi TM, et al. (2019). Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems — A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 57: 102192.
- Nongonierma AB, Maux S Le, Esteveny C, et al. (2016). Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(4): 1093–1101.
- Ozorio L, Pereira NR, Silva-Santos JE, et al. (2019). Enzyme inactivation and drying technologies influencing the vasorelaxant activity of a whey protein hydrolysate in semi-pilot scale. *International Dairy Journal* 93: 11–14.
- Peñas E, Restani P, Ballabio C, et al. (2006). Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. *European Food Research and Technology* 222(3): 286–290.
- Perreault V, Hénaux L, Bazinet L, et al. (2017). Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities. *Food Chemistry* 221: 1805–1812.
- Piccolomini AF, Iskandar MM, Lands LC, et al. (2012). High hydrostatic pressure pre-treatment of they proteins enhances whey protein hydrolysate inhibition of oxidative stress and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells. *Food & Nutrition Research* 56: 63–69.
- Ritchie H and Roser M. (2018). Causes of death. Available at: <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (accessed 22 March 2021).

- Singh A and Ramaswamy HS. (2014). Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. *International Journal of Food Science and Technology* 49(1): 269–279.
- Udenigwe CC and Mohan A. (2014). Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *Journal of Functional Foods* 8(1): 45–52.
- Yadav JSS, Yan S, Pilli S, et al. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/ nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 33(6): 756–774.
- Zheng H, Ziaoqin S, Bu G, et al. (2008). Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. *International Dairy Journal* 23(1): 69–82.
- Zhou H, Wang C, Ye J, et al. (2016). Effects of enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing on the hydrolysis and allergenicity of proteins from ginkgo seeds. *Food and Bioprocess Technology* 9(5): 839–848.
- Zulueta A, Esteve MJ and Frígola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry* 114(1): 310–316.

### 3 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo investigou o uso da alta pressão hidrostática na hidrólise das proteínas do soro de leite, utilizando as proteases pepsina, Novo Pro-D® e ficina. O aproveitamento do soro de leite é um modo vantajoso e sustentável de reduzir custos com tratamento de resíduos agroindustriais, empregando-o como matéria-prima para elaboração de diferentes coprodutos. A produção de hidrolisado a partir das proteínas do soro de leite mostrou ser uma alternativa promissora para obtenção de um ingrediente com características bioativas, como capacidade antioxidante e atividade anti-hipertensiva, apresentando reduzida antigenicidade em relação às proteínas íntegras. No entanto, foi evidente que a escolha da protease, bem como a utilização da tecnologia de alta pressão para auxiliar na proteólise, consistiram em pontos críticos do processo, pois influenciaram diretamente nas propriedades finais dos hidrolisados.

Sendo assim, as características dos hidrolisados produzidos variaram conforme o tratamento empregado. As proteínas do soro de leite, especialmente a  $\beta$ -Lg, apresentaram resistência à hidrólise péptica, devido à conformação estável da proteína em pH ácido. Desse modo, na hidrólise convencional, ou seja, à pressão atmosférica, foi a enzima que apresentou menor desempenho para hidrolisar as proteínas do soro de leite. Porém, o uso da APH como pré-tratamento, ou simultaneamente à hidrólise, foi uma estratégia eficiente para melhorar a hidrólise das proteínas do soro de leite. No processo de alta pressão hidrostática, as variáveis tempo e nível de pressão são comumente fatores importantes, no entanto, na hidrólise assistida por APH, somente o tempo teve efeito significativo no processo, com maior proteólise e resultando em hidrolisado com maior capacidade antioxidante *in vitro* no tratamento com a pressão de 100 MPa por 35 minutos.

A NPD é uma protease microbiana que apresenta amplo espectro de clivagem e, dentre as enzimas avaliadas, apresentou a maior capacidade de hidrolisar as proteínas do soro de leite, promovendo redução completa da  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La em poucos minutos de processo. As condições ótimas de pH e a temperatura da enzima podem favorecer a hidrólise das proteínas do soro de leite pela NPD, visto que podem ocorrer algumas alterações na estrutura da proteína. No entanto, o tratamento de APH foi utilizado com intuito de verificar as modificações nas propriedades finais dos hidrolisados. A estratégia de uso da APH como pré-tratamento foi a que apresentou melhor resultado para a NPD em termos de bioatividade. O pré-tratamento dobrou a capacidade antioxidante dos hidrolisados e contribuiu para redução de 100% da  $\beta$ -Lg imunorreativa, em um tempo menor do que o requerido no processo convencional.

A FC é uma protease de origem vegetal, não muito explorada para a hidrólise das proteínas do soro de leite. Apresentou maior capacidade de hidrolisar o WPC do que a pepsina, exibindo maior afinidade pela  $\beta$ -Lg. Além disso, no processo de hidrólise convencional, produziu um hidrolisado com capacidade anti-hipertensiva mais significativa que os hidrolisados produzidos pela NPD. O pré-tratamento também foi a melhor estratégia de uso da APH para auxiliar na hidrólise pela FC. Os tratamentos empregando à pressão de 400 MPa foram os que apresentaram maior influência, contribuindo para o aumento da hidrólise, da capacidade antioxidante e da redução da  $\beta$ -Lg imunorreativa do hidrolisado.

Considerando a particularidade de cada processo, os resultados aqui apresentados sugerem que as proteases NPD e FC têm amplo potencial para hidrólise do soro de leite, dado que apresentaram melhores resultados quando comparados a pepsina. No entanto, a escolha da protease deve considerar as propriedades finais que são desejadas dos hidrolisados. Além disso, a APH foi um processo importante para melhorar a eficiência da hidrólise das proteínas do soro de leite e, sobretudo, as propriedades finais de bioatividade dos hidrolisados, sendo a melhor estratégia de aplicação para auxiliar na hidrólise depende da protease escolhida.

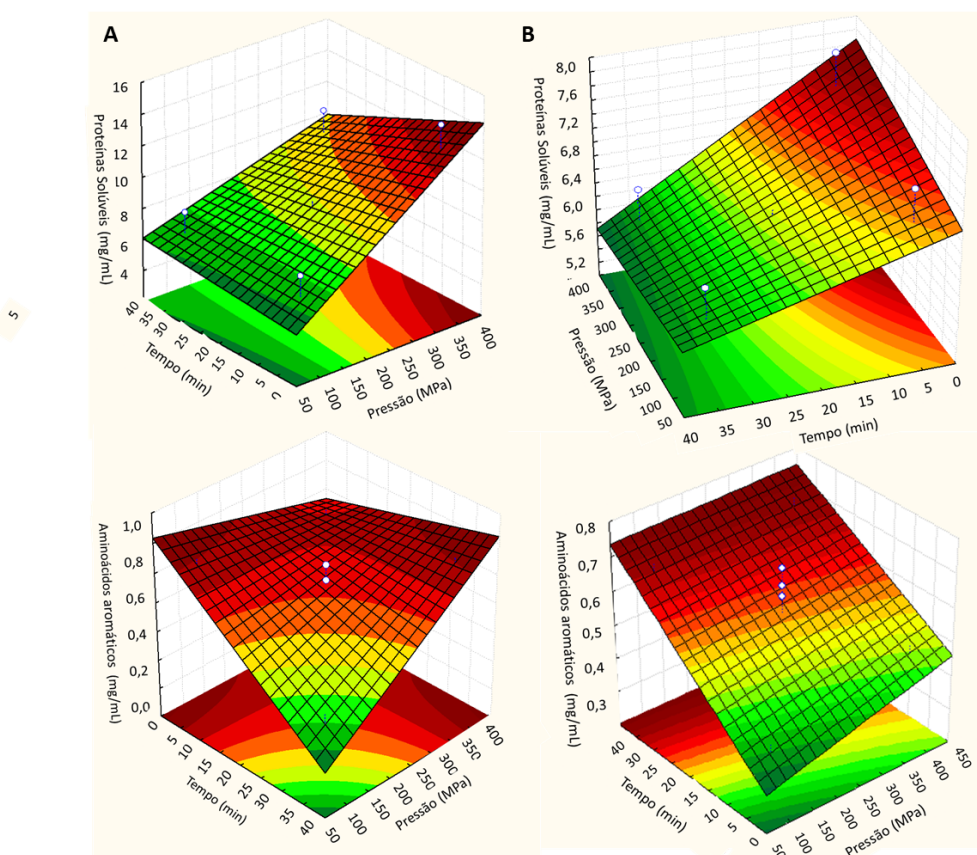


Finalmente, diante desses achados, parece pertinente recomendar que estudos complementares sejam desenvolvidos visando compreender como a alta pressão hidrostática impacta na melhoria das propriedades bioativas dos hidrolisados. Além disso, o desenvolvimento de estudos clínicos são de grande importância para validar as atividades biológicas avaliadas, bem como a redução da alergenicidade e atestar a segurança e estabilidade dos hidrolisados, para que diferentes produtos possam ser desenvolvidos. Desse modo, tendo em vista que os consumidores estão mais conscientes em relação aos hábitos alimentares, é importante que a indústria de alimentos esteja alinhada os desejos desse nicho de consumidores e forneça opções de produtos industrializados que ofereçam equilíbrio entre saudabilidade e praticidade, tornando os hidrolisados de proteínas, rico em peptídeos bioativos, uma opção viável de ingrediente para elaboração de alimentos funcionais.

## APÊNDICE I

O tratamento de hidrólise assistida (HA) por alta pressão hidrostática (APH) também foi avaliado para as proteases Novo Pro-D® (NPD) e ficina (FC) na hidrólise do WPC. Esses dados não foram inseridos nos artigos publicado e submetidos à publicação, mas seguem descritos nesse documento.

Diferentes níveis de pressão (100, 250 e 400 MPa) e tempo (5, 20 e 35 min) foram combinados e os seus efeitos avaliados em relação aos teores de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos (Figura 1). Para ambas as enzimas, as variáveis independentes de tempo e pressão não tiveram influência significativa, portanto não foi possível estabelecer um modelo para as respostas em função das variáveis.



**Figura 1** - Gráficos de superfície de resposta para o efeito da APH na hidrólise assistida (HA) do WPC nas diferentes condições do planejamento experimental em relação ao teor de proteínas solúveis e aminoácidos aromáticos para Novo Pro-D® na coluna A e, para Ficina na coluna B.

A redução no teor de proteínas solúveis e aumento do teor de aminoácidos aromáticos é um indicativo de que as proteínas foram parcialmente hidrolisadas, como pode-se observar na Tabela 1. Todos os tratamentos de HA utilizando a NPD e FC apresentaram diferenças significativas do WPC em relação ao teor de proteínas solúveis. A maior redução foi alcançada com a aplicação da pressão de 250 MPa por 20 minutos para ambas enzimas, apresentando 55,5 e 32,9% de redução para NPD e FC, respectivamente. No entanto, a capacidade de hidrolisar as proteínas do soro de leite durante a HA por APH foi menor que a observada a pressão ambiente

durante a hidrólise convencional, em que a redução do teor de proteínas solúveis foi de 91% após 15 minutos de processo para NPD e 56% após 120 minutos de processo para FC.

**Tabela 1** – Teor de proteínas solúveis e aminoácido aromáticos dos hidrolisados a partir da hidrólise do WPC nos diferentes tratamentos de hidrólise assistida por APH

Tratamentos		NPD		FC			
Pressão (MPa)	Tempo (minuto)	Proteínas Solúveis		Aminoácidos aromáticos	Proteínas Solúveis		Aminoácidos aromáticos
		Concentração (mg/mL)*	% *	Concentração (mg/mL)	Concentração (mg/mL)*	% *	Concentração (mg/mL)
		15,8a	-	0,03	9a	-	0,09
100	5	7,8d	50,6	0,52	7,4c	17,8	0,32
400	5	14,1b	10,9	0,63	8,0b	11,2	0,42
250	20	7,0e	55,5	0,66	6,0d	32,9	0,69
100	35	7,9d	49,9	0,64	6,5d	27,2	0,63
400	35	11,2c	28,9	0,06	6,4d	28,0	0,65

\*Letras minúsculas iguais no mesmo tratamento indicam que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pelo teste Tukey.

Os perfis peptídicos dos diferentes tratamentos são apresentados na Figura 2. Os perfis corroboram com os resultados discutidos anteriormente, em que a hidrólise realizada por ambas enzimas foi parcial em todos os tratamentos de HA. De modo oposto ao observado na hidrólise convencional usando a NPD, em que as principais proteínas do soro ( $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg) foram completamente hidrolisadas após poucos minutos de processo, no tratamento de HA, os picos referentes a  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg ainda estão presentes. Por outro lado, a FC promoveu completa hidrólise da  $\beta$ -Lg em todos os níveis de pressão e tempo utilizados nos tratamentos, enquanto na hidrólise convencional, ainda é possível notar a presença do pico referente a  $\beta$ -Lg.

Durante o tratamento de HA, a proteína e protease são pressurizadas e a hidrólise acontece simultaneamente com a aplicação da pressão. Diversos estudos mostraram que a HA é uma estratégia eficiente para aumentar a hidrólise das proteínas do soro de leite, reduzir o tempo de processo e aumentar o rendimento dos peptídeos e, consequentemente a bioatividade dos hidrolisados (BAMDAD; BARK; et al., 2017; CARULLO; BARBOSA-CÁNOVAS; FERRARI, 2020; LANDIM et al., 2021; LOZANO-OJALVO et al., 2017). Os efeitos da APH estão relacionados com as alterações estruturais e conformacionais que ocorrem nas proteínas e enzimas. O desdobramento proteico favorece a exposição de novos sítios de clivagem que antes não estavam acessíveis às enzimas, aumentando a eficiência do processo. No entanto, a pressão pode modificar o sítio catalítico das enzimas, causando uma melhora ou piora no desempenho da hidrólise das proteínas, embora ainda seja difícil afirmar o efeito da pressão sobre as enzimas, pois existem poucos estudos que buscam entender. Sendo assim, as diferentes enzimas podem apresentar maior ou menor sensibilidade frente a aplicação da pressão, e encontrar o equilíbrio entre nível de pressão e tempo de processo para o sistema (enzima-proteína) é fundamental para alcançar o máximo desempenho do processo.

Embora a pressão e o tempo não tenha apresentado influência significativa no processo de hidrólise pelas duas enzimas, os resultados apresentados na Tabela 1 sugerem que a NPD é mais sensível à pressão do que a FC, pois nos tratamentos com 400 MPa, a redução do teor de proteínas solúveis foi menor, quando comparada aos tratamentos que as pressões de 100 e 250 MPa foram utilizadas. Além disso, durante a HA não foi possível controlar parâmetros importantes para a atividade enzimática, como o pH e a temperatura. O controle do pH em reações que requerem valores de pH acima de 6,5 deve ser realizado, pois, a dissociação dos grupos aminas que são liberados durante quebra das ligações peptídicas, causa a queda do valor do pH escolhido para a reação. Sem o controle de pH, a diminuição é bem acentuada em função da pequena capacidade de tamponamento das proteínas em alguns pHs, distanciando do pH

ótimo das proteases e, conseqüentemente, gerando uma hidrólise menor das proteínas. ALEMÁN et al., 2011 realizaram diferentes experimentos com intuito de analisar o efeito da APH na hidrólise das proteínas. No primeiro, a hidrólise foi conduzida com controle de pH, no segundo sem controle de pH e o terceiro sem controle de pH e sob pressão. Ao comparar os processos sem controle de pH, observou que a hidrólise assistida por APH foi significativamente aumentada para todas as enzimas avaliadas, indicando que a APH pode melhorar a atividade das enzimas.

## REFERÊNCIAS

- ALEMÁN, A. et al. Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 46, n. 6, p. 1129–1136, 2011.
- BAMDAD, F. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Peptides Released from  $\beta$ -Lactoglobulin by High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis Fatemeh. **Molecules**, v. 22, p. 1–15, 2017.
- BELLOQUE, J.; CHICÓN, R.; LÓPEZ-FENDIÑO, R. Unfolding and Refolding of  $\beta$ -Lactoglobulin Subjected to High Hydrostatic Pressure at Different pH Values and Temperatures and Its Influence on Proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 13, p. 5282–5288, 2007.
- BONOMI, F. et al. Reduction of immunoreactivity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. **Journal of Dairy Research**. v. 70, n. 1, p. 51–59, 2003.
- CARULLO, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; FERRARI, G. Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, 2020.
- FRANCK, M. et al. High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. **Food Research International**, 2018.
- GARCIA-MORA, P. et al. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. **Food Chemistry**. v. 171, p. 224–232, 2015.
- LANDIM, A. P. M. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant capacity and peptic hydrolysis of whey proteins. **Ciência Rural**, v. 51, 2021.
- LOZANO-OJALVO, D. et al. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 154–162, 2017.
- NAZIR, M. A.; MU, T. H.; ZHANG, M. Preparation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sweet potato protein by enzymatic hydrolysis under high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 482–489, 2020.
- PEÑAS, E. et al. Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 286–290, 2006.
- ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 43, p. 92–101, 2017.
- ZHANG, T. et al. Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 904–912, 2012.

## APÊNDICE II

### Revisão a ser submetida no periódico *Ciência Rural*

#### **Efeito da alta pressão hidrostática na obtenção de hidrolisados com propriedades biológicas melhoradas e alergenicidade reduzida: uma revisão**

#### **Effect of high hydrostatic pressure on obtaining hydrolysates with improved biological properties and reduced allergenicity: a review**

#### **RESUMO**

Os hidrolisados de proteínas são conhecidos por conterem peptídeos biologicamente ativos que exercem diferentes benefícios para a saúde. A hidrólise enzimática é a melhor forma para produção de hidrolisados com propriedades bioativas, porém o uso de tecnologia como a alta pressão hidrostática (APH) pode ser uma importante ferramenta para aumentar a eficiência do processo. A APH modifica a estrutura e/ou conformação das proteínas e enzimas, favorecendo uma hidrólise mais intensa das proteínas e, conseqüentemente, o aprimoramento das propriedades dos hidrolisados. Desse modo, esta revisão discute o uso da AHP como ferramenta para melhorar o desempenho do processo e avalia os seus efeitos nas propriedades biológicas, como a atividade anti-hipertensiva e capacidade antioxidante, bem como na alergenicidade final dos hidrolisados.

**Palavras chaves:** Anti-hipertensivo, capacidade antioxidante, alergenicidade, hidrólise enzimática.

#### **ABSTRACT**

Protein hydrolysates are known to contain biologically active peptides that have different health benefits. Enzymatic hydrolysis is the best way to produce hydrolysates with bioactive properties, however, the use of technology such as high hydrostatic pressure (HHP) can be an important tool to increase the efficiency of the process. HHP modifies the structure and/or conformation of proteins and enzymes, favoring more intense hydrolysis of proteins and, consequently, the improvement of the biological properties of hydrolysates. Thus, this review discusses the use of HHP as a tool to improve the performance of the process and assesses its effects on biological properties, such as antihypertensive activity and antioxidant capacity, as well as on the final allergenicity of hydrolysates.

**Key words:** Antihypertensive, antioxidant capacity, allergenicity, enzymatic hydrolysis.

#### **INTRODUÇÃO**

Atualmente, a importância de consumir alimentos que tenham na sua composição substâncias que auxiliam na promoção da saúde ou diminuam o risco de doenças está bem difundida na sociedade, criando um nicho de oportunidades para a indústria de alimentos, o que motiva o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com alegação funcional (GRANATO et al., 2020; TADESSE; EMIRE, 2020).

Em vista disso, as proteínas hidrolisadas, contendo elevada quantidade de peptídeos biologicamente ativos, são uma alternativa promissora para a indústria, que busca inovar, fornecer produtos funcionais e atender essa parcela crescente de mercado (LAFARGA; HAYES, 2017). São produzidos a partir de várias fontes de proteínas alimentares, permitindo o aproveitamento de diferentes co-produtos com alto teor de proteína proveniente da agroindústria alimentar (NASRI, 2017; UDENIGWE; MOHAN, 2014).

A hidrólise das proteínas pode ser realizada por diferentes métodos, porém o uso de enzimas como catalisadores da reação é uma opção mais vantajosa (KORHONEN, 2009; NASRI, 2017). A maneira mais simples de conduzir a proteólise consiste no uso de diferentes

enzimas como catalisadores da reação de quebra da proteína em frações menores, produzindo uma mistura de peptídeos de diferentes tamanhos moleculares e aminoácidos livres (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2017). Vários fatores podem influenciar na eficiência da hidrólise e nas propriedades biológicas dos hidrolisados, como tipo e especificidade da enzima escolhida, pH, temperatura, grau de hidrólise, entre outros (CHEISON; KULOZIK, 2017; NASRI, 2017). No entanto, mesmo com a otimização destes parâmetros, obter uma hidrólise eficiente das proteínas ainda pode ser considerado um desafio, principalmente pela estrutura compacta do estado nativo de algumas proteínas (ABADÍA-GARCÍA et al., 2016; TAVARES et al., 2012). Por tanto, o uso da tecnologia de alta pressão hidrostática (APH) combinada com o processo de hidrólise tem se mostrado muito promissora (MARCINIAK et al., 2018).

A APH é uma realidade industrial, o que a torna, dentre as tecnologias emergentes não térmicas, possivelmente a mais bem sucedida. Essa tecnologia consiste em submeter alimentos sólidos ou líquidos, pré-embalados, a pressões elevadas que podem chegar até 1000 MPa. (POTTIER et al., 2017; YAMAMOTO, 2017). Nas proteínas, a APH atua sobre as interações inter e intramoleculares, acarretando alterações estruturais e conformacionais da molécula que favorecem uma hidrólise mais intensa e em um tempo menor de processo, bem como a melhora das propriedades biológicas dos hidrolisados e uma redução mais eficiente da antigenicidade das proteínas (ABADÍA-GARCÍA et al., 2016; MARCINIAK et al., 2018; YADAV et al., 2016). Dessa forma, esta revisão discute o uso da alta pressão hidrostática na hidrólise enzimática de diferentes matrizes proteicas e o impacto nas características finais dos hidrolisados quanto às propriedades biológicas relacionada a atividade anti-hipertensiva e capacidade antioxidante e alergenicidade.

#### *Efeito da APH na hidrólise das proteínas*

O grau de hidrólise das proteínas é um parâmetro muito importante para acompanhar a produção de hidrolisados proteicos, pois está diretamente relacionado à eficiência do processo. A quantidade de ligações peptídicas rompidas em uma reação de proteólise determina, em termos quantitativos, o grau que uma fonte proteica foi hidrolisada (RUTHERFURD, 2010).

Geralmente, o uso da APH como pré-tratamento ou simultâneo à hidrólise é uma ferramenta eficiente para aumentar o GH. O desdobramento da proteína induzida pelo pré-tratamento com APH aumenta a eficiência da hidrólise, porém as respostas podem diferir diante da matriz proteica selecionada para realizar o processo. Via de regra, o GH das proteínas de origem vegetal (lentilha, feijão e linhaça) foi mais expressivo quando submetidas ao pré-tratamento de APH utilizando a pressão de 300 MPa (AHMED et al., 2019; AL-RUWAIH et al., 2019; PERREAULT et al., 2017). No entanto, o tratamento com pressões superiores a 400 MPa induziu o aumento da interação proteína-proteína e, conseqüentemente, reduziu o GH devido à diminuição da quantidade de sítios disponíveis para as enzimas. Por outro lado, para outras proteínas como a  $\beta$ -Lg (BOUKIL et al., 2018; ZEECE et al., 2008) e as proteínas de pedúnculo de cogumelos (ZHAO et al., 2017), o uso de 400 MPa produziu hidrolisados com maior GH. Ao passo que as proteínas do ovo pré-tratadas à pressão de 550 MPa (SINGH; RAMASWAMY, 2014), 600 e 800 MPa (HOPPE et al., 2013) apresentaram maior GH.

A hidrólise assistida por APH também é uma estratégia eficiente para potencializar a reação e reduzir significativamente o tempo de processo, principalmente quando comparado ao processo convencional. No entanto, a sensibilidade da enzima deve ser considerada, pois, cada enzima possui uma faixa de pressão que irá favorecer sua atividade. Em diversos estudos a enzima alcalase exibiu maior GH quando submetida a pressões inferiores a 200 MPa (GARCIA-MORA et al., 2015; NAZIR et al., 2020; ZHANG; MU, 2017). Por outro lado, o uso de 300 – 400 MPa parece ter sido mais eficiente para melhorar a hidrólise das enzimas pepsina e tripsina (BELLOQUE et al., 2007; FRANCK et al., 2019; LOZANO-OJALVO et al., 2017; NAZIR et al., 2020).

#### *Efeito da APH na atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados*

A pressão arterial elevada é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, que é uma das principais causas de morte em adultos (GOMES et al., 2020). O interesse por terapias alternativas para o tratamento de hipertensão tem crescido, sobretudo devido aos efeitos colaterais que os tratamentos convencionais podem oferecer (PREMKUMAR et al., 2019). Desse modo, os hidrolisados proteicos, preparados a partir de diferentes fontes alimentares, têm sido exaustivamente estudados, por potencialmente conterem peptídeos biologicamente ativos que podem ser usados para o tratamento da hipertensão (MORALES-CAMACHO et al., 2019; ZHOU et al., 2015).

Os peptídeos apresentam atividade anti-hipertensiva por diferentes mecanismos. Existem evidências de que os peptídeos podem interagir com a renina, com receptores de angiotensina, com os canais de cálcio e com o sistema nervoso simpático, e ainda exercem efeitos sobre a função do sistema endotelina e na via do óxido nítrico (NO) (UDENIGWE; MOHAN, 2014). No entanto, o principal mecanismo estudado é a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). O sistema renina-angiotensina é um importante regulador da pressão arterial. A renina liberada do rim converte o angiotensinogênio em um peptídeo inativo, a angiotensina I (MAJUMDER; WU, 2015). A ECA hidrolisa este decapeptídeo em angiotensina II, que possui atividade vasoconstritora muito forte, regula o equilíbrio eletrolítico e exerce um estado pró-inflamatório (KOBORI et al., 2007; MAJUMDER; WU, 2015). Além disso, a ECA também atua no sistema caliceína-cinina, promovendo a degradação de bradicinina, que é um peptídeo conhecido pela sua ação vasodilatadora (GOMES et al., 2020). Portanto, a inibição da ECA é uma alternativa terapêutica para prevenir a hipertensão arterial e os peptídeos vêm sendo muito estudados quanto a capacidade de inibição destes sistemas.

Várias proteínas alimentares são estudadas como fontes de peptídeos anti-hipertensivos, mas ainda é um desafio desenvolver processos que apresentem máxima eficiência e sejam industrialmente viáveis. Além de buscar as melhores condições de hidrólise (enzima, tempo de reação, GH) para a produção de peptídeos, o uso de outras tecnologias com a APH, combinados com a hidrólise, pode ser importante para otimização da obtenção de hidrolisados com maior bioatividade. Embora muitas evidências demonstrem que a APH é apropriada para aumentar a eficiência em termos hidrolíticos, ainda existem poucos estudos que avaliaram a influência da APH na atividade anti-hipertensiva dos hidrolisados, sobretudo quando comparado à produção de hidrolisados convencional. Apesar disso, todos os estudos que avaliaram o uso da APH associada à hidrólise exibiram hidrolisados com maior rendimento de peptídeos e elevada potência na inibição da ECA, como em proteína de batata-doce (NAZIR et al., 2020), soja (GUAN et al., 2018), feijão (GARCIA-MORA et al., 2016), lentilha (GARCIA-MORA et al., 2015), ervilha (CHAO et al., 2013) e ovos (QUIRÓS et al., 2007).

A geração de peptídeos com atividade inibitória da ECA dos hidrolisados podem ser influenciados por vários fatores, dos quais se destaca o tipo de proteína, a enzima e sua especificidade. Além disso, os parâmetros empregados no processamento também são fatores importantes. NAZIR et al., (2020) avaliaram o uso de algumas enzimas que apresentaram a produção de peptídeos com capacidade de inibir a ECA otimizada em diferentes pressões. GUAN et al. (2018) reportaram que a pressão de 200 MPa foi mais eficiente para gerar hidrolisados com maior capacidade de inativar a ECA. Além disso, o uso da APH exige menor tempo de hidrólise para produzir hidrolisado com potencial anti-hipertensivo significativamente maior do que o obtido na hidrólise convencional (GARCIA-MORA et al., 2015; GUAN et al., 2018; QUIRÓS et al., 2007). Por fim, CHAO et al., (2013) observaram que o pré-tratamento com APH permitiu o uso de menor relação enzima: substrato durante a hidrólise, gerando maior produção de peptídeos com capacidade de inibir a ECA e a renina, tornando o processo mais eficiente.

A APH promove o desdobramento da proteína e a taxa de hidrólise aumenta, favorecendo a produção de maior quantidade de peptídeos ativos. Ao passo que a APH também

contribui para a produção de peptídeos com menor massa molecular, que é diretamente correlacionado com aumento da atividade de inibitória da ECA (ALUKO, 2015). Desse modo, a APH é uma tecnologia que favorece a obtenção de hidrolisados com maior atividade anti-hipertensiva, em menor tempo de processo e com menor concentração de enzimas, tornando o processo mais rápido e econômico, desde que os parâmetros sejam avaliados cuidadosamente.

#### *Efeito da APH na capacidade antioxidante dos hidrolisados*

Os peptídeos com capacidade antioxidante têm recebido atenção significativa pela indústria, e podem ser incorporados em alimentos com a finalidade de conservar ou promover melhorias das características bioativas (TADESSE; EMIRE, 2020). Podem atuar de diferentes formas para inibir a oxidação, principalmente na inativação de espécies reativas de oxigênio, eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição pró-oxidativos e redução de hidroperóxidos (ELIAS et al., 2008).

Durante a proteólise, vários parâmetros devem ser observados para se obter hidrolisados com elevada capacidade antioxidante, porém a protease escolhida determina a composição, sequência de aminoácidos e a massa molecular dos peptídeos, características intimamente relacionados com o potencial antioxidante de hidrolisados (ZHOU et al., 2016). A APH tem se mostrado como uma das tecnologias mais promissoras para contribuir com o aumento da produção de hidrolisados com capacidade antioxidante melhorada (CHAO et al., 2013; ZHANG et al., 2012).

Dentre as funcionalidades dos peptídeos, a capacidade antioxidante foi a mais estudada em relação ao uso da APH. Diferentes pesquisadores mostraram que o tratamento prévio das proteínas, ou a hidrólise assistida por APH, pode aumentar a capacidade antioxidante dos hidrolisados. AHMED et al., (2019) verificaram que o pré-tratamento a 300 MPa por 15 minutos aumentou a capacidade sequestrante do radical DPPH dos hidrolisados de proteína de lentilha. Resultados semelhantes foram observados por AL-RUWAIH et al., (2019) em hidrolisados de proteínas de feijão. ISKANDAR et al., (2015) pré-trataram a  $\beta$ -lactoglobulina com pressão de 550 MPa por 1 minuto e observaram que o hidrolisado obteve um aumento de 35% no FRAP em relação à proteína não tratada. LANDIM et al., (2021) também observaram aumento de 92% na capacidade antioxidante dos hidrolisados de soro de leite pré-tratados por APH quando comparado ao hidrolisado obtido na hidrólise convencional.

No processo hidrólise assistida por APH, a pressão pode ter efeito diferente conforme a enzima utilizada, como observado por GARCIA-MORA et al., (2016), que reportaram tal procedimento para a proteína de feijão não aumentou a capacidade doadora de átomos de hidrogênio quando a enzima alcalase foi utilizada. Já os hidrolisados obtidos a partir da hidrólise da protease savinase submetida à hidrólise assistida teve sua capacidade antioxidante aumentada, conforme o aumento da pressão. Por outro lado, a pressão potencializou a capacidade de doação de elétrons para ambas as enzimas, resultando nos maiores valores com hidrólise assistida a 100 MPa para alcalase e 200 MPa para savinase. Resultados similares foram reportados por GARCIA-MORA et al., (2015), em que as diferentes enzimas produziram hidrolisados com maior capacidade antioxidante em diferentes faixas de pressão, evidenciando a importância da otimização dos parâmetros de tempo e pressão, conforme a enzima utilizada.

O aumento desta bioatividade nos hidrolisados após o uso da APH pode ser relacionado ao desdobramento da proteína ou à ativação enzimática, que potencializa a produção de peptídeos em termos qualitativos e quantitativos, conferindo maior capacidade antioxidante por diferentes mecanismos. Além disso, a geração de peptídeos de baixa massa molecular, associado a liberação de aminoácidos livres também podem contribuir para o aumento da capacidade antioxidante dos hidrolisados pressurizados (CORROCHANO et al., 2019;



ISKANDAR et al., 2015), visto que APH pode intensificar a presença de aminoácidos livres, bem como influenciar em sua posição específica na sequência do peptídeo.

#### *Efeito da APH na alergenicidade dos hidrolisados*

A alergia alimentar é caracterizada por uma resposta excessiva do sistema imunológico contra determinadas substâncias presentes nos alimentos, conhecidas como alérgenos (SOMKUTI; SMELLER, 2013). Muitas pesquisas têm sido realizadas em busca da redução da antigenicidade das proteínas alimentares por diferentes processos que podem reduzir a presença dos epítomos alergênicos (CHIZOBA EKEZIE et al., 2018; VILLA et al., 2018). O epítomo é a região da proteína que se liga aos receptores celulares e aos anticorpos. Dois epítomos podem ser identificados nas proteínas: os lineares, que são sequências de aminoácidos específicos localizados na estrutura primária da proteína; e os conformacionais, que combinam aminoácidos de diferentes regiões da proteína que são dobradas em cadeias polipeptídicas (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2019).

Os epítomos conformacionais podem ser destruídos pela alteração da estrutura ou agregação das proteínas, porém os epítomos lineares de ligação IgE permanecem intactos, pois a estrutura primária não é alterada pela desnaturação (RAHAMAN et al., 2016). Para que ocorra a redução da presença dos epítomos lineares nas proteínas, é necessário usar processos que provoquem alteração na estrutura primária, como a hidrólise enzimática, que é um processo eficaz na redução da alergenicidade (KASERA et al., 2015). Apesar disso, as proteínas dos alimentos podem ser resistentes à proteólise e seus fragmentos podem manter a capacidade de sensibilização após a hidrólise, caso a sequência do epítomo seja preservada, apesar da hidrólise parcial da proteína. Desse modo, a combinação do uso APH com hidrólise enzimática uma estratégia que pode resultar em possível solução para as proteínas concentradas e isoladas, das mais diversas fontes alimentares.

A combinação da APH com a hidrólise enzimática tem apresentado efeito significativo na redução da alergenicidade das proteínas do soro de leite quando comparado à hidrólise convencional (PEÑAS et al., 2006a; PEÑAS et al., 2006b) ou com apenas a pressurização da proteína (MENG et al., 2017).

A estratégia de uso da APH para a hidrólise das proteínas pode afetar as características imunológicas dos hidrolisados, como relatado por CHICÓN et al., (2008), em que o pré-tratamento por APH da  $\beta$ -Lg não apresentou diferença na imunorreatividade em relação ao hidrolisado convencional. No entanto, o uso da hidrólise assistida por APH utilizando a pressão de 400 MPa por 20 min foi suficiente para que os hidrolisados não apresentassem ligações do tipo IgE significativas (CHICÓN et al., 2009). Apesar disso, o pré-tratamento da  $\beta$ -Lg com pressões superiores a 600 MPa, seguida de hidrólise, pode ser uma alternativa para reduzir significativamente a reatividade *in vitro* com IgE de indivíduos alérgicos, quando testado por ELISA indireto (BONOMI et al., 2003).

Além disso, o tempo de hidrólise é outro parâmetro importante. Em geral, o uso da APH pode favorecer a hidrólise da proteína nativa nos primeiros minutos de reação, contudo, pode não ser suficiente para redução da imunorreatividade dos hidrolisados, pois os fragmentos proteicos gerados no início da reação ainda podem conter os epítomos imunorreativos intactos (LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2008). LÓPEZ-EXPÓSITO et al. (2008) relataram que a imunorreatividade das proteínas de ovoalbumina hidrolisadas sob pressão diminuíram com o aumento do tempo de tratamento, porém ainda mantiveram pequena ligação residual perceptível à IgE de pacientes alérgicos ao ovo. Resultados semelhantes foram encontrados por CHICÓN et al., (2008) e CHICÓN et al., (2009), em que as proteínas do soro de leite hidrolisadas a pressão de 400 MPa apresentaram redução da antigenicidade progressiva com o tempo de tratamento, principalmente, em relação à proteína não pressurizada e hidrolisadas a pressão ambiente, porém as reações contra IgE ainda foram perceptíveis.

A APH causa mudança na conformação das proteínas que alteram os epítomos conformacionais, promove hidrólise mais intensa e, conseqüentemente, reduz os epítomos lineares. No entanto, ainda é necessário ser demonstrado se a maioria dos peptídeos formado retém epítomos de ligação de IgE relevantes. Estudos *in vivo* realizados por LÓPEZ-EXPÓSITO et al., (2012) em camundongos sensibilizados provaram que hidrolisados sob alta pressão hidrostática (400 MPa) de  $\beta$ -Lg são imunologicamente inertes. Em estudo realizado por LOZANO-OJALVO et al., (2017), os hidrolisados tratados a 400 MPa apresentaram presença de epítomos alergênicos de  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, porém nos testes realizados *in vivo* não foi perceptível reação como alteração de temperatura corporal, anafilaxia e sinais ou liberação de marcadores nos camundongos sensibilizados com o alérgeno. O estudo evidenciou que a APH pode produzir, em pouco tempo, hidrolisado hipoalergênico, sem a capacidade de estimular a produção de IgE e IgG.

Por fim, o desdobramento proteico induzido pelo tratamento de APH facilita a hidrólise enzimática, resultando em fragmentos de peptídeo mais curtos (7 e 10 resíduos de aminoácidos), que pode não ter epítomos suficientes para reagir com anticorpos, levando à redução da alergenicidade (BØGH et al., 2015; ZEECE et al., 2008). Levando isso em conta e considerando que o padrão peptídico e a imunorreatividade dos hidrolisados obtidos sob APH podem ser alterados pela seleção da enzima, pressão e tempo de hidrólise apropriados, pode ser possível obter hidrolisados com alergenicidade reduzida sem sensibilizar os pacientes susceptíveis a um determinado alérgeno, além de ser capaz de ajudar o sistema imunológico a desenvolver tolerância às proteínas em tratamentos terapêuticos (LÓPEZ-EXPÓSITO et al., 2012; LOZANO-OJALVO et al., 2017).

## CONCLUSÃO

A alta pressão hidrostática é uma tecnologia emergente que apresenta resultados promissores na produção de hidrolisados. O uso da APH como pré-tratamento ou simultânea à hidrólise são alternativas que permitem melhorar a eficiência do processo. De modo geral, o uso combinado da APH com a proteólise promove uma hidrólise mais intensa em diferentes matrizes proteicas, em tempo significativamente menor de processo e, ainda, permite o uso de menor quantidade de enzima em relação ao substrato, quando comparado ao processo convencional de hidrólise realizado a pressão ambiente. Além disso, os hidrolisados apresentam propriedades melhoradas quanto a atividade anti-hipertensiva, principalmente em relação à atividade inibidora da ECA *in vitro* e maior capacidade antioxidante *in vitro*. A APH também é uma ferramenta importante na produção de hidrolisados hipoalergênicos. No entanto, para se obter resultados otimizados é importante avaliar individualmente os parâmetros de processamento em relação à tecnologia de APH, pois como a tecnologia é utilizada (pré-tratamento ou simultânea à hidrólise), bem como os parâmetros de processo (nível de pressão e o tempo de processamento) podem impactar de maneira diferente em cada matriz proteica e enzima selecionada para a produção dos hidrolisados. Além disso, a maior parte das pesquisas que avaliaram o efeito da APH nas propriedades de promoção de saúde dos hidrolisados utilizaram ensaios *in vitro*. Desse modo, torna-se importante o uso de ensaios clínicos para fornecer evidências de que as propriedades alegadas são realmente aprimoradas e exercem efeitos em *in vivo*, tornando os hidrolisados ingredientes com potencial ainda maior de mercado para a indústria que busca atender um nicho de consumidores que estão mais preocupados com a relação de saúde e alimentação.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelas agências brasileiras Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Subsídio nº E-26 / 110.631 / 2012),

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

### CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

### DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### REFERÊNCIAS

- ABADÍA-GARCÍA, L. et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2016. v. 37, p. 84–90. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf103771x>>. Acesso em: 30 jun. 2018. doi: 10.1016/j.ifset.2016.08.010.
- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. v. 57, p. 1119–1132. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.899200>>. Acesso em: 25 mai 2021. doi: 10.1080/10408398.2014.899200.
- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. **Food Reviews International**, 2019. p. 276–295. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1701010>>. Acesso em: 19 jan 2021. doi: 10.1080/10408398.2014.899200.
- AHMED, J. et al. Effect of high-pressure treatment prior to enzymatic hydrolysis on rheological, thermal, and antioxidant properties of lentil protein isolate. **Legume Science**, 19 dez. 2019. v. 1, p. 1–13. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/leg3.10>>. Acesso em: 12 dez. 2020. doi: 10.1002/leg3.10.
- AL-RUWAIH, N. et al. High-pressure assisted enzymatic proteolysis of kidney beans protein isolates and characterization of hydrolysates by functional, structural, rheological and antioxidant properties. **Food Science and Technology**, 2019. v. 100, p. 231–236. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.074>>. Acesso em: 15 dez. 2020. doi: 10.1016/j.lwt.2018.10.074.
- ALUKO, R. E. Structure and function of plant protein-derived antihypertensive peptides. **Current Opinion in Food Science**, 2015. v. 4, p. 44–50. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.002>>. Acesso em: 13 dez. 2020.
- BELLOQUE, J. et al. Unfolding and refolding of  $\beta$ -lactoglobulin subjected to high hydrostatic pressure at different pH values and temperatures and its influence on proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007. v. 55, n. 13, p. 5282–5288. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf070170w>>. Acesso em: 5 jun. 2020.
- BØGH, K. L. et al. Characterization of the immunogenicity and allergenicity of two Cow's milk Hydrolysates - A study in brown norway rats. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2015. v. 81, n. 5, p. 274–283. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25619117/>>. Acesso em: 5 jun. 2020. doi:10.1111/sji.12271.
- BONOMI, F. et al. Reduction of immunoreactivity of bovine  $\beta$ -lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment. **Journal of Dairy Research**, 2003. v. 70, n. 1, p. 51–59. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12617393/>>. Acesso em: 5 dez. 2020.
- BOUKIL, A. et al. Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Membrane Science**, 2018. v. 556, p. 42–53. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.03.079>>. Acesso em: 13 dez. 2020. doi: 10.1016/j.memsci.2018.03.079.

CHAO, D. et al. Effect of pressure or temperature pretreatment of isolated pea protein on properties of the enzymatic hydrolysates. **Food Research International**, 2013. v. 54, n. 2, p. 1528–1534. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.020>>. Acesso em: 14 dez. 2020. doi: 10.1016/j.foodres.2013.09.020.

CHEISON, S. C.; KULOZIK, U. Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. v. 57, n. 2, p. 418–453. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25976220/>>. Acesso em: 26 set. 2019. doi: 10.1080/10408398.2014.959115.

CHICÓN, R. et al. Proteolytic pattern, antigenicity, and serum immunoglobulin e binding of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. **Journal of Dairy Science**, 2008. v. 91, p. 928–938. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208713481>> Acesso em: 22 nov. 2020. doi:10.3168/jds.2007-0657.

CHICÓN, R. et al. Food Hydrocolloids Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. **Food Hydrocolloid**, 2009. v. 23, p. 593–599. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X08000635>> Acesso em: 25 jan. 2021. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.04.001

CHIZOBA EKEZIE, F. G. et al., Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. **Trends in Food Science and Technology**, 2018. v. 74, p. 12–25. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.007> Acesso em: 18 jan. 2021. doi: 10.1016/j.tifs.2018.01.007.

CORROCHANO, A. R. et al. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Dairy Science**, 2019. v. 102., p. 526-535. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030218309950>>. Acesso em: 25 fev. 2021. doi: 10.1016/j.jff.2018.08.043.

ELIAS, R. J. et al. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2008. v. 48, p. 430–441. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408390701425615>>. Acesso em: 15 jan. 2020. doi: 10.1080/10408390701425615.

FRANCK, M. et al. High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis improved protein digestion of flaxseed protein isolate and generation of peptides with antioxidant activity. **Food Research International**, 2019. v. 115, p. 467–473. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30599966/>>. Acesso em: 11 nov. 2019. doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.034.

GARCIA-MORA, P. et al. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins. **Food Chemistry**, 2015. v. 171, p. 224–232. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814614013417>>. Acesso em: 3 out. 2018.

GARCIA-MORA, P. et al. High-pressure-assisted enzymatic release of peptides and phenolics increases angiotensin converting enzyme I inhibitory and antioxidant activities of pinto bean hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016. v. 64, n. 8, p. 1730–1740. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b06080>>. Acesso em: 3 nov. 2020. doi: 10.1021/acs.jafc.5b06080.

GOMES, C. et al. Current genetic engineering strategies for the production of antihypertensive ACEI peptides. **Biotechnology and Bioengineering**, 2020. v. 117, n. 8, p. 2610–2628. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.27373>>. Acesso em: 24 fev. 2021. doi: 10.1002/bit.27373

GRANATO, D. et al. Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, 2020. v. 11, p. 1–26. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>>. Acesso em: 15 fev. 2021.

GUAN, H. et al. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high

hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. **Food Chemistry**, 2018. v. 245. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814617314164>>. Acesso em: 25 nov. 2020. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.081.

HOPPE, A. et al. Effect of high pressure treatment on egg white protein digestibility and peptide products. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2013. v. 17, p. 54–62. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.003>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ISKANDAR, M. M. et al. High hydrostatic pressure pretreatment of whey protein isolates improves their digestibility and antioxidant capacity. **Foods**, 2015. v. 4, p. 184–207. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2304-8158/4/2/184/>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

KASERA, R. et al. Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity. **Food and Chemical Toxicology**, 2015. v. 76, p. 54–60. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.023>>. Acesso em: 20 jan. 2021. doi: 10.1016/j.fct.2014.11.023.

KOBORI, H. et al. Intratubular renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacological Reviews**, 2007. v. 59, p. 251–287. Disponível em: <<https://doi.org/10.1124/pr.59.3.3>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, 2009. v. 1, n. 2, p. 177–187. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>>. Acesso em: 15 jan. 2021. doi: 10.1016/j.jff.2009.01.007

LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. **Food Reviews International**, 2017. v. 33, n. 3, p. 217–246. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/87559129.2016.1175013>>. Acesso em: 24 jan. 2021. doi: 10.1080/87559129.2016.1175013

LANDIM, A. P. M. et al. Effect of high hydrostatic pressure on the antioxidant capacity and peptic hydrolysis of whey proteins. **Ciência Rural**, 2021. v. 51, n. 4. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200560>>. Acesso em: 15 mar. 2021.

LÓPEZ-EXPOSITO, I. et al. *In vivo* methods for testing allergenicity show that high hydrostatic pressure hydrolysates of  $\beta$ -lactoglobulin are immunologically inert. **Journal of Dairy Science**, 2012. v. 95, n. 2, p. 541–548. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281318/>>. Acesso em: 25 nov. 2019. doi: 10.3168/jds.2011-4646

LÓPEZ-EXPOSITO, I. et al. Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, 2008. v. 56, p. 11809–11816. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf8023613>>. Acesso em: 25 jan. 2018. doi: 10.1021/jf8023613.

LOZANO-OJALVO, D. et al. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017. v. 43, n. February, p. 154–162. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.032>>. Acesso em: 12 dez. 2018. doi: 10.1016/j.ifset.2017.07.032.

MAJUMDER, K.; WU, J. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015. v. 16, n. 1, p. 256–283. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547491/>>. Acesso em: doi: 10.3390/ijms16010256

MARCINIAK, A. et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. **Trends in Food Science and Technology**, 2018. v. 80, p. 187–198. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418301122>>. Acesso em: 11 nov. 2019. doi: 10.1016/j.tifs.2018.08.013.

MENG, X. et al. Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **Food Chemistry**, 2017. v. 219, p. 290–296. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.153>>. Acesso em: 15 fev.

2021. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.153.

MORALES-CAMACHO, J. I. et al. Insertions of antihypertensive peptides and their applications in pharmacy and functional foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019. v. 103, n. 6, p. 2493–2505. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-09633-1>> Acesso em: 25 fev. 2021. doi: 10.1007/s00253-019-09633-1.

NASRI, M. **Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review**. 1. ed.[S.l.]: Elsevier Inc., 2017. V. 81.

NAZIR, M. A. et al. Preparation and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from sweet potato protein by enzymatic hydrolysis under high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Science and Technology**, 2020. v. 55, n. 2, p. 482–489. Disponível em: <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14291>>. Acesso em: 24 fev. 2021. doi: 10.1111/ijfs.14291

PEÑAS, E. et al. High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, 2006a. v. 16, p. 969–975. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694605002293>>. Acesso em: 21 out. 2018.

PEÑAS, E. et al. Assessment of the residual immunoreactivity of soybean whey hydrolysates obtained by combined enzymatic proteolysis and high pressure. **European Food Research and Technology**, 2006b. v. 222, p. 286–290. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-005-0108-9>> Acesso em: 25 fev. 2019. doi: 10.1007/s00217-005-0108-9.

PERREAULT, V. et al. Pretreatment of flaxseed protein isolate by high hydrostatic pressure: Impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant capacities. **Food Chemistry**, 2017. v. 221, p. 1805–1812. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.100>>. Acesso em: 15 nov. 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.100.

POTTIER, L. et al. Applications of high pressure for healthier foods. **Current Opinion in Food Science**, 2017. v. 16, p. 21–27. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.009>>.

PREMKUMAR, J. et al. A critical review on food protein derived antihypertensive peptides. **Drug Invention Today**, 2019. v. 12, n. 3, p. 474–479.

QUIRÓS, A. et al. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. **Food Chemistry**, 2007. v. 104, p. 1734–1739. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814606008351>>. Acesso em: 25 out. 2018. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.10.050.

RAHAMAN, T. et al. Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. **Trends in Food Science and Technology**, 2016. v. 49, p. 24–34. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001>>. Acesso em: 25 fev. 2020.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A Review. **Journal of AOAC International**, 2010. v. 93, n. 5, p. 1515–1522.

SINGH, A.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. **International Journal of Food Science and Technology**, 2014. v. 49, n. 1, p. 269–279. Disponível em: <<https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12443>> Acesso em: 25 fev. 2019. doi: 10.1111/ijfs.12443.

SOMKUTI, J.; SMELLER, L. High pressure effects on allergen food proteins. **Biophysical Chemistry**, 2013. v. 183, p. 19–29. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.009>>. Acesso em: 23 dez. 2020. doi: 10.1016/j.bpc.2013.06.009.

TADESSE, S. A.; EMIRE, S. A. Production and processing of antioxidant bioactive peptides: A driving force for the functional food market. **Heliyon**, 2020. v. 6, n. 8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04765>>. Acesso em: 15 fev. 2021. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04765

TAVARES, T. G. et al. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Journal of Food Engineering**, 2012. v. 110, p. 547–552. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877412000295>>. Acesso em: 3 out. 2018.

UDENIGWE, C. C.; MOHAN, A. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. **Journal of Functional Foods**, 2014. v. 8, n. 1, p. 45–52. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.002>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

VILLA, C. et al. Bovine milk allergens: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2018. v. 17, p. 137–164. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12318>>. Acesso em: 16 fev. 2021. doi: 10.1111/1541-4337.12318.

YADAV, D. N. et al. Development of protein fortified mango based ready-to-serve beverage. **Journal of Food Science and Technology**, 2016. v. 53, n. 10, p. 3844–3852. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073497501530015X>> Acesso em: 25 jan. 2018. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002.

YAMAMOTO, K. Food processing by high hydrostatic pressure. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2017. v. 81 p. 672–679. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09168451.2017.1281723>>. Acesso em: 25 nov. 2020. doi: 10.1080/09168451.2017.1281723.

ZEECE, M. et al. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2008. v. 9, n. 1, p. 62–69. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.05.004>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ZHANG, M.; MU, T. H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2017. v. 43, p. 92–101. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.001>>. Acesso em: 18 fev. 2018. doi: 10.1016/j.ifset.2017.08.001

ZHANG, T. et al. Combined effects of high-pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis of chickpea protein isolates and antioxidant activity of the hydrolysates. **Food Chemistry**, 2012. v. 135, n. 3, p. 904–912. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22953804/>>. Acesso em: 30 out. 2018. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.097.

ZHAO, R. J. et al. Ultra-high-pressure processing improves proteolysis and release of bioactive peptides with activation activities on alcohol metabolic enzymes in vitro from mushroom foot protein. **Food Chemistry**, 2017. v. 231, p. 25–32. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.058>>. Acesso em: 25 jan. 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.058.

ZHOU, H. et al. Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing on the Hydrolysis and Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds. **Food and Bioprocess Technology**, 2016. v. 9, p. 839–848. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-016-1676-3>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

ZHOU, Z.; CHENG, C.; LI, Y. Structure-based design and optimization of antihypertensive peptides to obtain high inhibitory potency against both renin and angiotensin I-converting enzyme. **SAR and QSAR in Environmental Research**, 2015. v. 26, p. 1001–1016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/1062936X.2015.1104725>>. Acesso em: 25 jan. 2021.