

PRETHODNO PRIOPĆENJE

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na konformacijske promjene proteina sirutke

Maja Dent^{a*}, Dražen Vikić-Topić^b, Slavica Moše^a, Gordana Jovičić^a, Damir Kovaček^a^aPrehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb^bInstitut Rudjer Bošković, Centar za NMR, Bijenička 54, Zagreb**Sažetak**

Konformacijske promjene proteina sirutke (β – laktoglobulin, koncentrat i izolat proteina sirutke) praćene su pod djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka od 300, 400, 500 i 600 MPa. Djelovanje povišenog hidrostatskog tlaka uzrokuje konformacijske promjene koje dovode do denaturacije proteina sirutke. Nastaju značajne promjene u tercijarnoj strukturi proteina koja je stabilizirana vodikovim vezama i drugim intermolekularnim silama. Ireverzibilne denaturacije koje dovode do agregacije i formiranja gela dolaze do izražaja pri tlakovima većim od 400 MPa.

Ključne riječi: proteini sirutke, β – laktoglobulin, WPC, WPI, visoki tlak**Abstract**

Conformational changes of whey protein (β – lactoglobuline, whey protein concentrate and isolate) were monitored under the influence of high hydrostatic pressure of 300, 400, 500 and 600 MPa. The high hydrostatic pressure causes conformational changes that lead to denaturation of whey protein. Pressure induced changes in tertiary structure which is stabilized by hydrogen bonding and other intermolecular forces of whey proteins. Irreversible denaturation leading to aggregation and gel formation occurs under pressure higher than 400 MPa.

Keywords: whey proteins, β – lactoglobuline, WPC, WPI, high pressure*corresponding author: mfeges@pbf.hr**Uvod**

Obrada visokim hidrostatskim tlakovima kao novija metoda minimalne obrade hrane je trenutno jedna od najviše istraživanih tehnika kao dobra alternativa konvencionalnim postupcima obrade hrane. Komercijalno je dostupna za cijeli niz proizvoda kao što su mlijeko, voćni sokovi, mesni proizvodi, gotovi proizvodi, i dr. (Norton and Sun, 2008). Djelovanje visokog tlaka se zasniva na Le Chatelier - Braunovom principu kada dolazi do smanjenja radnog volumena kako se tlak u sustavu povećava. Visoki tlak se oko namirnice koja se obrađuje ravnomjerno raspoređuje, ne utječe značajno na povišenje temperature procesa, pa time ostaju u većoj mjeri očuvana fizikalno – kemijska svojstva hrane (Bosiljkov i sur., 2013). Prednost primjene visokih tlakova je u tome se što obrada visokim tlakovima provodi vrlo kratko vrijeme od nekoliko sekunda do nekoliko minuta pri tlakovima od 100 do 1000 MPa, iako se mogu doseći vrijednosti tlakova i do 1300 MPa. Djelovanjem visokog tlaka osim učinka konzerviranja namirnica, inaktivacije mikroorganizama i nativnih enzima, postiže se i modifikacija mehanizma te poboljšanja pojedinih procesa u prehrambenoj industriji (Huppertz i sur., 2006). Proces obrade visokim tlakovima ima potencijal modifikacije funkcionalnih svojstava biopolimera te postizanja funkcionalnosti proizvoda. Upravo su proteini podložni promjenama konformacije i funkcionalnih svojstava (Krešić i sur., 2011).

Sirutka kao nusprodukt, nastaje u proizvodnji sira ili kazeina, a predstavlja vrijedan izvor proteina. Pošto je lako pokvarljiva i dobar supstrat za razvoj mikroorganizama, potrebno ju je što prije prevesti u odgovarajući proizvod. Sirutki proteini su vrlo vrijedni sastojci koji doprinose nutritivnoj vrijednosti, a uglavnom se koriste zbog svojih funkcionalnih svojstava: dobre topljivosti, viskoznosti, sposobnosti stvaranja pjene, sposobnost stvaranja gela, emulgiranja te sposobnosti vezanja vode (Lisak Jakopović i sur., 2016). Ultrafiltracijom sirutke se dobiva prah koncentrata (WPC) ili izolata proteina sirutke (WPI) sa sadržajem od 60 % proteina u suhoj tvari. Izolat proteina sirutke sadrži veću koncentraciju proteina i manje nečistoća od koncentrata proteina sirutke. Proteini se mogu koncentrirati do 90 % udjela u suhoj tvari, ali ekonomski gledano daljnje koncentriranje je opravdano samo ukoliko se ovaj proizvod ugrađuje u konačni proizvod visoke tržišne vrijednosti. Koncentrat proteina sirutke i izolat proteina sirutke se najčešće koriste u prehrambenoj industriji u obliku dodataka na bazi proteina sirutke u svrhu poboljšanja funkcionalnosti proizvoda. Koncentrat proteina sirutke primjenjuje se u industriji budući da utječe na reološka svojstva gotovog proizvoda ili služi kao dobra zamjena za mast (Zhang i sur., 2016a). Djelovanjem visokog tlaka na koncentrat i izolat proteina sirutke, dolazi do promjena u strukturi proteina i do promjene reoloških svojstava gotovog proizvoda (Krešić i sur., 2008). Postupcima djelomične denaturacije proteina sirutke može se utjecati na funkcionalna svojstva proteina, a time i na strukturu gotovog



proizvoda (Zhang i sur., 2016). Proteini sirutke su prema strukturi kompaktni globularni proteini s relativno podjednakom raspodjelom niza hidrofobnih, polarnih, neutralnih te nenabijenih ili nabijenih ostataka aminokiselina. Proteini su u svom nativnom stanju stabilizirani kovalentnim vezama, disulfidnim mostovima, vodikovim vezama, te hidrostatskim i hidrofobnim interakcijama. Intramolekularno nabrana struktura proteina sirutke je rezultat disulfidnih veza između ostataka cisteina, koje su unutar molekule uglavnom prekrivene hidrofobnim ostacima. Od ukupnih proteina sirutke u mlijeku najviše ima β -laktoglobulina i α -laktalbumina. β -laktoglobulin je dimer, sastavljen od dva identična peptidna lanca, koji se čvrsto drže zajedno pomoću nekovalentnih veza, s ukupno 162 aminokiseline u monomeru. U globuli β -laktoglobulina je zastupljen dio α -uzvojnice i β -nabrane strukture, te dio neodređene strukture (slučajna klupka). α -laktalbumin je vrlo kompaktan protein, skoro okruglog oblika koji ima homolognu primarnu strukturu. Sastoji se od lanca s oko 123 aminokiseline, bogat je s triptofanom, sadrži disulfidne veze, a nema slobodne sulfidrilne skupine (Tratnik, 1998).

Uslijed djelovanja visokim hidrostatskim tlakovima dolazi do denaturacije nekih frakcija proteina sirutke (Baier i sur., 2015). Na kovalentne veze visoki tlak gotovo da nema utjecaja, tako da primarna struktura proteina ostaje očuvana tijekom cijelog tretmana visokim tlakom. Tercijarna i kvarterna struktura proteinskih lanaca mijenja se pri tlakovima višim od 100 MPa. Promjene u sekundarnoj strukturi vode do ireverzibilne denaturacije, budući da je stabilizacija vodikovim vezama jača pri niskim tlakovima, a poremećena samo pri vrlo visokim tlakovima (Baier i sur., 2015). Najčešće dolazi do pucanja slabih vodikovih, ionskih i hidrofobnih veza, dok kovalentne ostaju nepromijenjene (Huppertz i sur., 2002). Veća otpornost α -laktalbumina na djelovanje viših tlakova leži u većem broju disulfidnih veza i izostanku slobodnih sulfidrilnih skupina. Na denaturaciju β -laktoglobulina, osim djelovanja visokog tlaka, utjecaj ima i duljina vremena tretiranja, temperatura i pH mlijeka (Krešić i sur., 2011). Na temperaturi višoj od 60 °C dolazi do denaturacije β -laktoglobulina. α -laktalbumin je nešto otporniji te podnosi više temperature (Huppertz i sur., 2006). Pod utjecajem povišenog tlaka dolazi do promjena u sekundarnoj strukturi β -laktoglobulina, kao i izolata proteina sirutke budući da dolazi do nestabilnosti α -strukture i β -nabrane ploče uslijed promjena u hidrofobnosti (Baier i sur., 2015). FTIR spektroskopija je učinkovita tehnika kojom možemo odrediti dolazi li do konformacijskih promjena sekundarne, tercijarne ali i kvaterne strukture proteina (Lefèvre and Subirade, 2001). Informacije o strukturi proteina nam daju amidne vibracije koje se pojavljuju između 1600 – 1700 cm^{-1} . Najintenzivnija vibracijska vrpca je amid I vrpca koja potječe od vibracije C=O grupe u kojoj je kisik vezan vodikovom vezom za drugi dio polipeptidnog lanca proteina. Povišeni tlak uzrokuje intenzivne konformacijske promjene na proteinima sirutke koje se vide u valnom području amidnih vibracija (Heremans and Smeller, 1998). Promjene u konformaciji proteina doprinose funkcionalnim svojstvima proteina i značajno utječu na njihovu funkcionalnost (Baier i sur., 2015a).

Proteini sirutke se koriste kao dodaci u proizvodnji hrane u svrhu poboljšanja funkcionalnih svojstava gotovog proizvoda. Uslijed djelovanja povišenih tlakova na proteine sirutke dolazi do konformacijskih promjena proteina, a time i do

promjene funkcionalnih svojstava proteina kao što su svojstvo želiranja, emulgiranja, pjenjenja, promjena u topljivosti i viskoznosti i dr. Cilj rada je ispitati utjecaj djelovanja visokih tlakova na konformacijske promjene proteina sirutke. Evidentno je da utjecajem visokih tlakova (300, 400, 500 i 600 MPa) kroz 5 i 10 minuta dolazi do promjena u konformaciji proteina sirutke koje vode do ireverzibilne denaturacije, što se u mjerenjima očituje kao promjena apsorbance. Iz promjena u apsorpciji mogu se izvesti zaključci o stupnju denaturacije β -laktoglobulina, koncentrata proteina sirutke (WPC) i izolata proteina sirutke (WPI), odnosno da li je došlo do razaranja primarne, sekundarne, tercijarne ili kvaterne strukture.

Materijali i metode rada

Proteini sirutke

Koncentrat proteina sirutke (Milacteal 60) je dobiven ultrafiltracijom seruma kezeina proizvedenog od Molkerei Strothmann (Guestersloh, Germany). Izolat proteina sirutke komercijalnog naziva BiPro i β -laktoglobulin su proizvedeni od Davisco Food International (Le Sueur, MN, USA). Za analizu su uzorci otopljeni u deioniziranoj vodi uz miješanje na magnetskoj miješalici kroz 30 minuta. U tablici 1 je prikazan kemijski sastav za β -laktoglobulin, WPC (koncentrat proteina sirutke) i WPI (izolat proteina sirutke), izražen na suhu tvar prema deklaraciji proizvođača.

Tablica 1. Kemijski sastav za β -laktoglobulin, WPC (koncentrat proteina sirutke) i WPI (izolat proteina sirutke) izražen na suhu tvar prema deklaraciji proizvođača.

Table 1. Chemical composition of β -lactoglobuline, WPC (whey protein concentrate) and WPI (whey protein isolate) specification declared by manufacturer.

COMPOSITION/ SASTAV(%)	WPC	WPI	β -laktoglobulin
Proteini/Proteins	60,8	92,9	30
Laktoza/Lactose	25	-	0,1
Masti/Fats	6,9	0,5	0,6
Pepeo/Ash	4,2	1,7	0,7
Voda/Moisture	3,1	5	5

Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom

Tretiranje visokim hidrostatskim tlakovima provedeno je u laboratorijskom uređaju LAB 50, SIG Simonazzi, Parma, Italija) pri tlakovima od 300, 400, 500 i 600 MPa uz zadržavanje pri konstantnom tlaku kroz 5 i 10 minuta. Svi uzorci koncentrata proteina sirutke, izolata proteina sirutke i β -laktoglobulin tretirani su pri istim uvjetima uzimajući u obzir adijabatsko zagrijavanje koje se javlja u fazi kompresije. S obzirom na nemogućnost tretiranja praškastih materijala, tretiranje visokim tlakom provedeno je na 10 % - tnm otopinama proteina sirutke. Nakon provedenog tretiranja svi uzorci su liofilizirani te potom skladišteni pri temperaturi od 25 °C.

FTIR spektroskopija

Za snimanje IR spektara su korištene KBr pastile, a mjerenje je provedeno na uređaju ABB Bomem, MB 102 FTIR spektrofotometar (ABB Bomem Inc, Quebec, Canada). Primjenom razlikovne spektroskopije mjerene su apsorbancija i valni broj. Snimanje je obavljeno za tri grupe uzoraka: β – laktoglobulin, koncentrat proteina sirutke i izolat proteina sirutke.

minuta, na kemijske promjene proteina sirutke. Primjenom razlikovne FTIR spektroskopije mjerene su apsorbancija (A) uz pripadajući valni broj (cm^{-1}). Razlikovni spektri su napravljeni tako da su oduzete vrijednosti uzoraka netretiranih visokim tlakom od uzoraka tretiranih visokim tlakom za β – laktoglobulin, izolat proteina sirutke i koncentrat proteina sirutke (tablice 2 i 3). U FTIR spektrima primijećeno je najviše promjena signala u području od $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$.

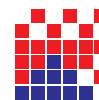
Rezultati i rasprava

Proučavan je utjecaj visokim hidrostatskim tlakovima (300, 400, 500 i 600 MPa) pri vremenu tretiranja od 5 i 10

Tablica 2. Vrijednosti apsorbance i valnih brojeva dobivenih razlikovnom FTIR spektroskopijom za β -laktoglobulin, WPI i WPC tretiranih visokim hidrostatskim tlakom (300, 400, 500 i 600 MPa) kroz 5 i 10 minuta.

Table 2. Values of absorbance and wave numbers obtained by differential FTIR spectroscopy for β -lactoglobuline, WPI and WPC under high hydrostatic pressure (300, 400, 500 i 600 MPa) for 5 and 10 minutes.

<i>p</i> (MPa)	<i>t</i> (min)	Apsorbancija/ Absorbance(A)	Valni broj/ Wavenumber (cm^{-1})	Apsorbancija/ Absorbance (A)	Valni broj/ Wavenumber (cm^{-1})
β - laktoglobulin					
300	5	-11,277	1651,9	-	-
	10	-4,191	1682,7	-	-
400	5	-4,092	1661,5	-	-
	10	-13,986	1651,9	-	-
500	5	-20,027	1651,9	-	-
	10	-12,865	1651,9	-	-
600	5	-9,481	1651,9	-	-
	10	-11,347	1651,9	-	-
WPI					
300	5	-9,096	1651,9	-	-
	10	-9,328	1683,7	18,019	1615,2
400	5	-5,982	1683,7	8,698	1615,2
	10	-7,278	1682,7	3,888	1616,2
500	5	-7,689	1698,1	3,588	1616,2
	10	-9,024	1682,7	4,825	1616,2
600	5	4,833	1700,1	-	-
	10	-2,876	1653,8	-	-
WPC					
300	5	-0,785	1653,8	-	-
	10	-0,739	1676,9	7,802	1616,2
400	5	0,580	1664,4	5,921	1616,2
	10	-7,729	1666,3	1,649	1616,2
500	5	-2,651	1665,4	6,910	1616,2
	10	-5,228	1665,4	1,332	1616,2
600	5	3,303	1664,4	8,321	1616,2
	10	-4,025	1664,4	-2,946	1616,3



Tablica 3. Vrijednosti apsorbance i valnih brojeva dobivenih FTIR spektroskopijom za β -laktoglobulin, WPI i WPC netretiranih visokim tlakom.

Table 3. Values of absorbance and wavenumbers obtained by differential FTIR spectroscopy for β -lactoglobuline, WPI and WPC not treated under high hydrostatic pressure.

UZORAK/ SAMPLE	Valni broj/ Wavenumber (cm^{-1})	Apsorbanca/ Absorbance (A)
β - laktoglobulin	1653,8	27,210
WPI	1653,8	31,342
WPC	1653,8	36,718

Analiziramo li djelovanja primjenjenih visokih tlakova na β -laktoglobulin kroz 5 minuta (tablica 2), možemo zaključiti da apsorbance pri tlaku 300 MPa u početku raste od -11,277 pri valnom broju 1651,9 cm^{-1} do apsorbance -4,092 pri valnom broju 1661,5 cm^{-1} . Povećanjem tlaka do 400 MPa, apsorbance raste jer su u tom području tlaka promjene u konformaciji proteina reverzibilne. Intramolekularna nabrana struktura β -laktoglobulina je rezultat disulfidnih veza između ostataka cisteina, koje su unutar molekula prekrivene hidrofobnim ostacima. Do promjena u β -nabranom sloju dolazi u području od 1500 – 1600 cm^{-1} . Razmatanjem α -uzvojnice unutar β -laktoglobulina dolazi do denaturacije. Iznad vrijednosti tlaka od 400 MPa se apsorbance smanjuje (-20,027), dok kod 600 MPa bilježi rast kod istih valnih duljina (1651,9 cm^{-1}) jer dolazi do ireverzibilnih denaturacija. Nastaju značajne promjene u terciarnoj strukturi proteina, uglavnom kod hidrofobnih i ionskih interakcija (Huppertz i sur., 2002). Rezultati za uzorke izolata proteina sirutke tretiranih visokim tlakom kroz 5 minuta pokazuju očekivani trend rasta i smanjivanja apsorbance i valnog broja kao i kod β -laktoglobulina. Pri tlaku od 300 MPa, apsorbance raste od -9,096 kod valnog broja 1651,9 cm^{-1} do apsorbance -5,982 i valnog broja 1683,7 cm^{-1} kod 400 MPa. Porastom tlaka na 500 MPa, apsorbance se smanjuje na -7,689 kod valnog broja 1698,1 cm^{-1} , da bi porastom tlaka na 600 MPa se ponovo povećala kod valnog broja 1700,1 cm^{-1} . Visoki tlak uzrokuje stvaranje vodikovih veza i kidanje hidrofobnih veza što dovodi do denaturacije proteina sirutke. Atom vodika vezan je vodikovom vezom za atom kisika i drugi dio polipeptidnog lanca, što rezultira nestabilnom konformacijom proteina. Rezultati za koncentrat proteina sirutke tretiranog visokim tlakom kroz 5 minuta pokazuje isti trend kretanja apsorbance i valnog broja. Pri tlaku od 300 MPa, apsorbance raste od -0,785 kod valnog broja 1653,8 cm^{-1} do 0,580 kod valnog broja 1664,4 cm^{-1} . Porastom tlaka na 500 MPa, apsorbance se smanjuje na -2,651 kod valnog broja 1665,4 cm^{-1} , da bi porastom tlaka na 600 MPa se ponovo povećala dok je valni broj ostao približno isti 1664,4 cm^{-1} . Iz prikazanih rezultata, možemo zaključiti da apsorbance ne raste jednoliko s tlakom, nego se kod vrijednosti tlaka od 400 MPa počinje smanjivati. To ukazuje na povećan udio ireverzibilnih denaturacija u područjima visokih tlakova, iznad 400 MPa. Pregledom literature, u području od 1600 – 1700 cm^{-1} , pojavljuje se amid I vrpca, koja daje informacije o sekundarnoj strukturi proteina. Amidna grupa daje specifične

vibracijske modove, takozvane amidne modove, među kojima je amid I vrpca najintenzivnija i najviše proučavana (Heremans and Smeller, 1998). Amid I vrpca potječe od vibracije C=O grupe u kombinaciji s N-H i C-N vibracijom rastezanja (Lefèvre and Subirade, 2001). Kod interpretacije rezultata, signal koji se pojavljuje na 1615 cm^{-1} odgovara amid vrsti vibracija nastalih zbog intenzivnih konformacijskih promjena u proteinima sirutke. Dodatno povećanje temperature i tlaka rezultira nastankom novih vodikovih veza koje usporavaju amidnu vibraciju i bilježe pomak prema kraćim valnim brojevima (Lefèvre and Subirade, 2001). Tretiranjem uzorka koncentrata proteina sirutke kroz 10 minuta vidi se trend promjene intenziteta kod valnog broja 1616 cm^{-1} . Porastom tlaka smanjuje se apsorbance koja kod 300 MPa iznosi 7,8, a kod 600 MPa iznosi -2,9. Smanjenje apsorbance s porastom tlaka ukazuje na konformacijske promjene u strukturi koncentrata proteina sirutke. Do promjena dolazi u terciarnoj strukturi proteina, uglavnom kod hidrofobnih i ionskih interakcija. Iz rezultata za koncentrat proteina sirutke može se zaključiti da su konformacijske promjene izraženije pri manjim tlakovima (300, 400 MPa), dok pri većim tlakovima je njihov intenzitet manji, iako su i dalje prisutne. Pri tlaku od 300 MPa, kroz 10 minuta tretiranja visokim tlakom su zabilježene maksimalne vrijednosti valnih brojeva za β -laktoglobulin i koncentrat proteina sirutke, dok za izolat proteina sirutke je to bio tlak od 600 MPa kroz 5 minuta tretiranja.

Zaključci

Konformacijske promjene proteina sirutke su izraženije pri manjim tlakovima (300, 400 MPa), dok pri većim tlakovima je njihov intenzitet manji, iako su i dalje prisutne. Iz prikazanih rezultata možemo zaključiti da visoki tlak utječe na promjene u strukturi proteina što dovodi do konformacijskih promjena koje vode do denaturacije proteina sirutke. Do pomaka u valnom broju dolazi zbog različitog stupnja konformacijskih promjena, a povećanje apsorbance ukazuje na povećan stupanj denaturacije. Do 400 MPa apsorbance raste s povećanjem tlaka jer su u tom području promjene u konformaciji proteina reverzibilne. Iznad vrijednosti od 400 MPa se apsorbance smanjuje jer dolazi do ireverzibilnih denaturacija, pri čemu nastaju značajne promjene u terciarnoj strukturi proteina, uglavnom kod hidrofobnih i ionskih interakcija.

Literatura

Baier, D., Purschke, B., Schmitt, C., Rawel, H.M., Knorr, D. (2015). Effect of high pressure – low temperature treatments on structural characteristics of whey proteins and micellar caseins. *Food Chemistry*, 187, 354-363.

Baier, D., Schmitt, C., Knorr, D. (2015a). Changes in functionality of whey proteins and micellar caseins after high pressure – Low temperature treatments. *Food Hydrocolloids*, 44, 416-423.

Bosiljkov, T., Brnčić, M., Karlović, S., Tripalo, B., Ježek, D., Dujmić, F., Vadjla, D. (2013). Application of Ultrasound and High Hydrostatic Pressure on Variation of Fat Globule Size and Chemical Composition of Cow Milk. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 8(3-4), 82-89.



Heremans, K., Smeller, L. (1998): Protein structure and dynamics at high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1386, 353-370.

Huppertz, T., Kelly, A.L., Fox, P.F. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal*, 12(7), 561-572.

Huppertz, T., Smiddy, M.A., Upadhyay, V., Kelly, A.L. (2006). High-pressure changes in bovine milk: a review. *Conference Contribution*, 59(2), 58-66.

Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Rimac Brnčić, S. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87, 64-73.

Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011). Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kemija u industriji*, 60(1), 11-19.

Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., Božanić, R. (2016). Physiological significance, structure and isolation of α – laktalbumin. *Mljekarstvo*, 66(1), 3-11.

Lefèvre, T., Subirade, M. (2001). Molecular structure and interaction of biopolymers as viewed by Fourier transform spectroscopy: model studies on β – laktoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 365-376.

Norton, N., Sun, D.W. (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 2-34.

Tratnik, Lj. (1998). Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 13-42.

Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J., Euston, S.R. (2016). Properties of partially denaturated whey protein products: Formation and characterisation of structure. *Food Hydrocolloids*, 52, 95-105.

Zhang, Z., Arrighi, V., Campbell, L., Lonchamp, J., Euston, S.R. (2016a). Properties of partially denaturated whey protein products 2: Solution flow properties. *Food Hydrocolloids*, 56, 218-226.