

IMPACT OF THERMAL TREATMENT ON THE PROPERTIES OF THE PROTEIC FOAMS[♦]

IMPACT DU TRAITEMENT THERMIQUE SUR LES PROPRIETES DES MOUSSES PROTEIQUES

**Irina Nicorescu^{1,3,*,#}, Christophe Vial², Gholamreza Djelveh²,
Catherine Loisel³, Alain Riaublanc⁴, Jack Legrand⁵**

¹*Université « Claude Bernard » Lyon 1, IUT A, Rue Henri de Boissieu,
01000, Bourg-en-Bresse, France*

²*Clermont Université, École Nationale Supérieure de Chimie du
Clermont-Ferrand, LGCB, 24 avenue des Landais, 63174 Aubière, France*

³*GEPEA-ONIRIS, Rue de la Géraudière, 44322 Nantes Cedex 03, France*

⁴*INRA-BIA, Rue de la Géraudière, 44316 Nantes Cedex 03, France*

⁵*GEPEA, Université de Nantes, CNRS, UMR 6144, 44602 Saint-Nazaire,
France*

*Corresponding author: nicorescuirina@yahoo.com

Received: May 25, 2010

Accepted: January 19, 2010

[♦] Paper presented at the 6th edition of *Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée, COFrRoCA 2010*, 7-10 July 2010, Orléans, France

[#] **Present address:** Université de Rouen, Laboratoire de Microbiologie du Froid - Signaux et Microenvironnement, 55 Rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France

Abstract: The food foams are "whipped" products that have recently experienced significant growth in the food industry. They are appreciated by consumers for their creamy texture, taste and visual aspect. Whey proteins are particularly common ingredients in the formulation of food foams because of their functional properties (foaming properties, interfacial, emulsifying). Denaturation and aggregation of whey proteins further to a heat treatment, allows the improvement of these properties by creating protein aggregates with targeted properties.

The objective of this study is to understand the impact of the intensity of heat treatment applied to a protein solution on the aggregation of proteins (proportion, size and morphology of protein assemblies) and on their foaming properties in order to better control the use properties of foamed products stabilized by whey protein aggregates (WPI). In this work, a 2% w/v of whey proteins in the presence of salt (50 mM NaCl) was heated in an *Actijoule* type tubular heat exchanger at 80, 90 and 100 °C. Native and denatured solutions of WPI were characterized by microcalorimetry (μ -DSC), size exclusion chromatography (SEC), diffusion light scattering (DLS), electrophoresis (SDS-PAGE), optical microscopy and atomic force microscopy (AFM). To assess the impact of thermal treatment on the foaming ability of protein solutions, a bubbling method has been employed. The experimental results showed that as far as the heating temperature is increased, it promotes the aggregation of proteins into oligomers which then are forming soluble aggregates of about 160 nm in diameter. We have also observed that the increase of this fraction is a continuous function of temperature for solutions treated up to 100 °C. However, the amount of insoluble aggregates formed reaches a maximum when the heat treatment temperature is 90 °C. Finally, we showed by SDS-PAGE that the soluble and insoluble aggregates are stabilized by disulfide bridges and microscopically we found that insoluble aggregates are dense and highly branched. With regard to the foaming properties of proteins, the formation of the foam was very dependent on the thermal treatment applied to protein solutions. Our results demonstrate as well that the time of bubbling is clearly correlated with the proportion of insoluble proteins and for this reason, a thermal treatment at 90 °C that leads to a significant increase of the proportion of insoluble aggregates, retards foam formation. Also, β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin monomers existing in the protein solutions before bubbling, appear to play a crucial role. Thus, we observed that native WPI solutions lead to the formation of dry foams, while the WPI solutions heated to temperatures of at least 80 °C lead rather to the formation of wet foams.

Keywords: *bubbling, protein aggregates, thermal treatment, whey proteins*

INTRODUCTION

Les protéines de lactosérum et notamment la β -lactoglobuline (β -Lg) ont été largement utilisées en nutrition animale, et actuellement, elles suscitent un intérêt dans le domaine alimentaire, en particulier dans les produits allégés en matière grasse ou encore dans les crèmes glacées [1]. Sous l'effet de traitements thermiques ou thermomécaniques, les protéines sériques se dénaturent, puis s'agrègent [2 – 4]. Lors du chauffage, le mécanisme de dénaturation de la β -Lg débute par la dissociation de la structure dimérique de la molécule dans les conditions de pH et de concentration du lait. La rupture de la structure quaternaire et les modifications des structures tertiaire et secondaire de la β -Lg conduisent à deux grands événements: (1) l'exposition du groupement sulfhydryle de la protéine qui entraîne des échanges de ponts disulfures au sein même de la molécule ou avec une protéine voisine; (2) le déplissement de la protéine qui conduit à une augmentation de l'exposition de ses zones hydrophobes internes et, par la suite, à l'association de plusieurs zones hydrophobes entre elles. Ces deux événements vont finalement aboutir à la formation d'agrégats [5]. Selon la littérature [6], la dénaturation et l'agrégation modifient la structure des protéines sériques en solution et par conséquent leurs propriétés interfaciales. Zhu et Damodaran [7] ont montré que l'amélioration des propriétés moussantes des solutions de WPI est due à des changements conformationnels, notamment à des changements dans la structure secondaire, mais aussi et surtout au rapport des concentrations de monomères et d'agrégats protéiques. Par ailleurs, ces auteurs ont démontré que les monomères contribuent plutôt au moussage, alors que les agrégats jouent un rôle clef sur la stabilité des mousses. Il semblerait que les agrégats protéiques contribuent principalement à renforcer la stabilité de la mousse parce que les films formés par les monomères ne semblent pas fournir les propriétés viscoélastiques nécessaires à la stabilisation des interfaces gaz-liquide. Toutefois, le mécanisme par lequel les agrégats protéiques contribuent à stabiliser les mousses n'est pas encore totalement élucidé. L'objectif de cette étude consiste donc à comprendre l'impact de l'intensité du traitement thermique appliqué à une solution protéique sur l'agrégation des protéines (proportion, taille, morphologie des assemblages protéiques) et sur leurs propriétés moussantes de façon à mieux maîtriser les propriétés d'usage des produits foisonnés stabilisés par des agrégats de protéines sériques (WPI).

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été menée dans une gamme de température comprise entre 80 et 100 °C sur une solution de WPI à 2% w/v, à pH neutre, et pour une force ionique correspondant à 50 mM de NaCl. Des mesures de microcalorimétrie différentielle (μ -DSC), de diffusion statique et dynamique (DLS) de la lumière, de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et d'électrophorèse (SDS-PAGE) ont été réalisées afin de déterminer la température optimale du traitement thermique dans le but de former des agrégats induits par la chaleur et également de mieux comprendre à terme le rôle de ces agrégats sur les propriétés physiques des mousses de WPI.

L'aptitude au foisonnement des solutions de WPI natives, ainsi que des solutions de WPI traitées thermiquement a été étudiée par une technique de bullage utilisant un appareil appelé *FoamScan* (IT Concept, France). Celui-ci comporte une colonne en verre non thermostatée (250 mm de hauteur pour un diamètre de 19 mm) équipée de quatre électrodes permettant la mesure de la conductivité de la mousse (Figure 1). La mousse formée est éclairée par une source lumineuse uniforme, de type sphère d'intégration, l'image vue de profil est projetée par un objectif télécentrique sur une caméra CCD, puis numérisée et visualisée par un logiciel pour suivre l'évolution de la mousse au cours du temps.

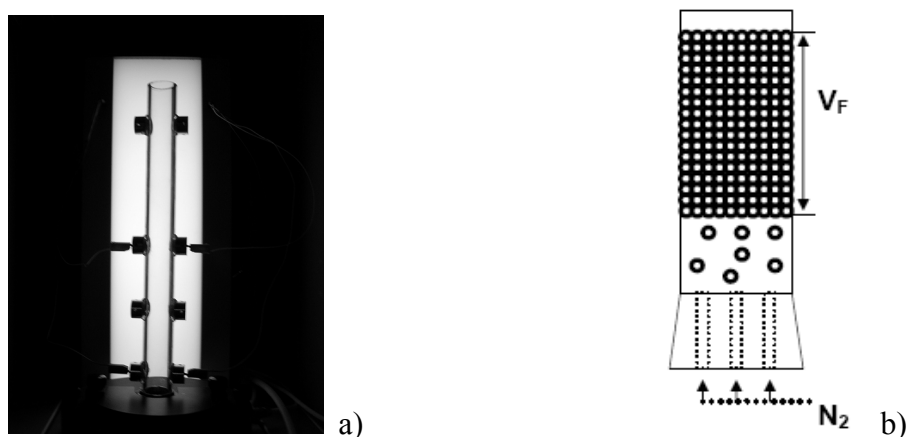


Figure 1. Schéma de la colonne du *FoamScan* équipée de 4 électrodes

Après la calibration des électrodes, deux étapes ont été réalisées pour chaque échantillon. Dans un premier temps, nous avons procédé au bullage dans 12 mL de solution protéique par injection d'azote en pied de colonne à travers un fritté (no. 6). Le débit de gaz a été fixé à $35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Lorsque le volume de la mousse a atteint 35 mL, l'injection de gaz a été arrêtée. Commence alors la deuxième étape au cours de laquelle la stabilité de la mousse a été évaluée en mesurant la variation de volume et le drainage en fonction du temps. Les paramètres caractéristiques de la mousse ont été enregistrés à l'aide du logiciel « *FoamScan* ». Une paire d'électrodes localisée en bas de la colonne a été utilisée pour mesurer la quantité de liquide qui n'a pas été intégrée dans la mousse, alors que le volume de liquide dans la mousse a été estimé par conductimétrie en utilisant trois paires d'électrodes localisées le long de la colonne. Pour chaque solution traitée, trois répétitions ont été effectuées. Le temps requis pour former un volume de mousse de 35 mL (ou temps de bullage), la densité, ainsi que la stabilité (exprimée par le temps de demi-vie) de la mousse ont été mesurés afin de caractériser les propriétés moussantes des solutions protéiques étudiées.

RESULTATS

Caractérisation des solutions de protéines sériques (WPI)

Dans notre étude, les résultats obtenus par μ -DSC révèlent que pour les solutions protéiques traitées à moins de 80°C , les valeurs de l'enthalpie restent identiques à la

précision près des mesures à celles des protéines natives. En revanche, à partir de 80 °C, une diminution de la valeur de l'enthalpie de 10,31 J·g⁻¹ à 0,99 J·g⁻¹ (cas des échantillons traités thermiquement à 100 °C) a été observée. Comme l'indique le Tableau 1, le processus de dénaturation des WPI a débuté pour un traitement thermique à 80 °C, ce qui correspond à un degré de dénaturation de 28%. En revanche, la dénaturation des WPI est quasiment complète pour les traitements thermiques à 90 et à 100 °C. Le Tableau 1 regroupe les niveaux de dénaturation obtenus par μ -DSC et également les résultats respectifs sur les fractions soluble et insoluble obtenus par SEC, DLS et centrifugation. Les mesures après centrifugation confirment que la proportion d'agrégats insolubles a augmenté fortement lorsque la température du traitement thermique a été portée à 80 et à 90 °C, comme attendu à partir du Tableau 1 si l'on suppose que la dénaturation et l'agrégation sont couplées.

Les mesures de DLS sur les échantillons centrifugés (i.e. sans agrégats insolubles) nous ont permis de mieux comprendre l'évolution de la population des agrégats solubles. Les résultats expérimentaux montrent que l'augmentation progressive de la température du traitement thermique favorise l'agrégation des dimères et oligomères et la formation d'agrégats solubles autour de 160 nm de diamètre (Tableau 1). Ceci est en accord avec les résultats cités précédemment pour lesquels une dénaturation complète a été observée sur les échantillons traités à 90 et à 100 °C.

Tableau 1. Propriétés des solutions de WPI 2% (50 mM NaCl) natives et traitées entre 80-100 °C

Solution	Viscosité [Pa.s]	Degré de dénaturation par DSC [%]	Agrégats solubles par SEC [% w/w]	Diamètre moyen par DLS [nm]	Agrégats insolubles par centrifugation [% w/w]
native	0,0067	-	-	186	0,5
80 °C	0,0063	28	10	132	6,3
90 °C	0,0069	85	50	122	10,0
100 °C	0,0071	90	71	158	4,3

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) nous a permis de quantifier la proportion d'agrégats solubles et de protéines dénaturées non-agrégées formées suite au traitement thermique choisi. Elle confirme que la formation d'agrégats solubles de poids moléculaires plus élevés que dans les solutions de WPI natives débute à 80 °C par la production d'environ 10% d'agrégats solubles présentant un diamètre moyen de 130 nm. Après un traitement thermique plus intense à 100 °C, la fraction des protéines polymérisées atteint 71% de l'ensemble des protéines sériques solubles. A travers les résultats expérimentaux précédents, nous avons donc montré que la taille, ainsi que la proportion des agrégats protéiques solubles et insolubles peuvent varier considérablement en fonction du traitement thermique appliqué.

Afin d'étudier l'effet spécifique du traitement thermique sur la morphologie des agrégats protéiques solubles formés par traitement thermique, un microscope à force atomique (AFM) a été employé. La fraction d'agrégats solubles dont la caractérisation a été réalisée par AFM (Figure 2) a montré un étalement important lorsque la solution de WPI a été placée sur un mica hydrophile. En revanche, lorsque la même solution a été

déposée sur un support en graphite hydrophobe, les agrégats se sont moins bien étalés et sont plutôt restés bien individualisés.

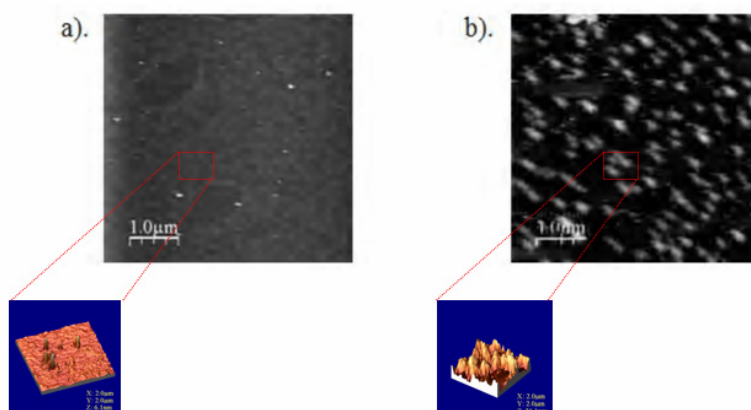


Figure 2. Images des agrégats solubles obtenus pour une solution de WPI traitée thermiquement à 90 °C en fonction du support utilisé :
a) support hydrophile en mica; b) support hydrophobe en graphite

Les échantillons des solutions de WPI natives et traitées thermiquement entre 80 et 100 °C ont été analysés par électrophorèse en l'absence et en présence de 2- β -mercaptoéthanol (β -ME). La présence de β -ME nous a permis d'évaluer la contribution des ponts disulfures sur la formation des agrégats protéiques dans la fraction soluble, ainsi que dans la fraction insoluble. Dans le cas de la solution de WPI natives, le gel d'électrophorèse en conditions non-réductrices montre clairement la formation d'un dépôt en haut du gel de séparation et également la formation de bandes intenses correspondant aux monomères de β -Lg et d' α -La dans le gel de séparation. Toutefois, nous avons observé que les quantités relatives aux monomères d' α -La et de β -Lg sont très faibles après traitement thermique, ce qui indique que ces espèces ont été polymérisées sous la forme d'agrégats solubles et insolubles de masses moléculaires plus élevées pendant le traitement thermique. En effet, l'augmentation de la température du traitement thermique conduit à une pénétration plus lente des gros agrégats dans le gel de concentration, ce qui prouve que les tailles des agrégats sont plus importantes. Lorsque les échantillons de WPI ont été analysés par électrophorèse en présence de β -ME, les gros agrégats protéiques qui, en absence de β -ME, n'étaient pas en mesure de pénétrer dans le gel de concentration ont été dissociés. En même temps, des bandes relatives à la BSA, ainsi qu'aux monomères de β -Lg et d' α -La, aux dimères covalents de β -Lg et aux trimères covalents de β -Lg et de β -Lg/ α -La ont été observées, ce qui démontre le rôle des ponts disulfures sur l'agrégation des WPI.

Propriétés foisonnantes des protéines

L'aptitude au foisonnement des solutions à 2% w/v de WPI natives, ainsi que des solutions de WPI traitées thermiquement dans une gamme de températures comprises entre 80 – 100 °C a été étudiée par une technique de bullage. A partir du Tableau 2 qui présente l'évolution de la formation de la mousse par bullage, nous avons constaté que

les échantillons de WPI traités à des températures supérieures ou égales à 80 °C présentent des propriétés moussantes très différentes de celles des solutions de WPI natives. Tout d'abord, le temps de bullage nécessaire pour produire 35 mL de mousse a fortement augmenté lorsque la température du traitement thermique était supérieure ou égale à 80 °C (Tableau 2). On notera également que le temps de bullage le plus élevé a été observé dans le cas de la solution de WPI chauffée à 90 °C. Cependant, l'aptitude au foisonnement des solutions de protéines natives ou traitées thermiquement n'a fait apparaître aucune différence significative pendant les 30 premières secondes de bullage, alors qu'au delà de 30 s, le processus de formation de la mousse semble être ralenti par la présence des agrégats solubles et insolubles (Tableau 2). L'évolution de la mousse durant le bullage, et plus particulièrement la différence observée entre la pente de la courbe de bullage des échantillons natifs et celles des échantillons traités thermiquement au delà de 30 s pourrait donc être attribuée aux monomères de β -Lg et d' α -La qui jouent un rôle crucial au début de la formation de la mousse. Dans le cas des échantillons traités thermiquement, les monomères/dimères/trimères de β -Lg et d' α -La sont présents en proportions plus faibles que dans les échantillons de WPI natives et les agrégats solubles et insolubles qui les ont remplacés semblent moins aptes à former une mousse. Un comportement particulier a été observé lors du bullage de la solution protéique chauffée à 90 °C et ce comportement pourrait être attribué à la proportion élevée d'agrégats insolubles qui présente une valeur maximale à cette température.

Tableau 2. Caractérisation des mousses protéiques générées par bullage

Échantillon	Temps de bullage [s]	Densité maximale	Temps de demi-vie [s]	Volume final de mousse* [%]	Fraction insoluble [%]
native	73	0,14	145	61	0,5
80 °C	157	0,22	78	35	6,3
90 °C	180	0,18	77	40	10,0
100 °C	145	0,20	76	37,8	4,3

* 100 s après la fin du bullage

On notera qu'après dénaturation/agrégation des solutions protéiques, les mousses contiennent presque deux fois plus de liquide, comme le confirment les valeurs de la densité de mousses présentées dans le Tableau 2. Puisque la taille des bulles dans la mousse n'est pas significativement différente, ceci pourrait s'expliquer par la formation de films plus épais entre les bulles due à la présence des agrégats dans les films. En conséquence, les solutions de WPI natives conduiraient à la formation de mousses sèches, alors que les solutions de WPI chauffées à des températures supérieures ou égales à 80 °C conduiraient à la formation de mousses humides lorsqu'une technique de foisonnement par bullage est utilisée.

En ce qui concerne le processus de déstabilisation, la stabilité de la mousse a été estimée quantitativement par le volume de liquide drainé au cours du temps. Par exemple, pour les échantillons de protéines natives, la déstabilisation de la mousse se déroule très lentement ; tandis que pour les solutions de WPI chauffées à des températures supérieures ou égales à 80 °C, la déstabilisation se produit d'une façon plus rapide et surtout plus brutale. Toutefois, on notera que l'évolution des courbes lors de la

déstabilisation est plus difficile à interpréter puisque le taux de foisonnement diffère fortement en fonction des conditions de traitement thermique lorsque le gaz est arrêté.

DISCUSSION

Les résultats obtenus dans notre étude ont clairement indiqué que la dénaturation des protéines sériques devient significative pour un traitement thermique à une température de 80 °C et que les solutions protéiques ont subi une dénaturation quasiment complète pour des traitements à 90 °C et au delà. A partir des mesures de DLS et de SEC, nous avons également pu remarquer qu'au fur et à mesure que la température du traitement thermique est augmentée, celui-ci favorise la polymérisation des protéines qui forment par la suite des agrégats solubles d'environ 160 nm de diamètre, puis des agrégats insolubles. Enfin, nous avons observé que l'augmentation de la fraction soluble des agrégats est continue en fonction de la température pour les solutions traitées jusqu'à 100 °C. En revanche, la quantité d'agrégats insolubles formés passe par un maximum lorsque la température du traitement thermique est de 90 °C. En effet, Morr et Josephson [8] ont signalé qu'à pH neutre, les protéines dénaturées par la chaleur interagissent via des réactions irréversibles thiol-disulfure afin de former des agrégats protéiques qui, par la suite, vont se regrouper sous la forme de grosses particules qui vont finalement sédimenter. Barlow, Hardham et Zadow [9] ont également souligné que lorsque le traitement thermique est réalisé dans des conditions trop favorables à l'agrégation des protéines, la production de gros agrégats sédimentables peut constituer un problème critique. Il faut cependant noter que nos données expérimentales ont démontré que la proportion d'agrégats insolubles diminue soudainement lorsque le traitement thermique est conduit à 100 °C (Tableau 1). Enfin, nous avons également montré par SDS-PAGE que le traitement thermique provoque la formation d'assemblages protéiques primaires associés principalement par des ponts disulfures, qui se réassocient sous forme de structures plus grosses stabilisées probablement par des liaisons hydrophobes ; en effet, l'AFM nous a permis de constater une différence significative au niveau de l'étalement des agrégats protéiques sur un support hydrophobe et sur un support hydrophile.

Le processus de formation de la mousse s'est montré très dépendant du traitement thermique appliqué aux solutions protéiques. Tout d'abord, le temps de bullage nécessaire pour produire 35 mL de mousse (Tableau 1) a fortement augmenté lorsque la température du traitement thermique était supérieure ou égale à 80 °C, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux présentés par Zhu et Damodaran [7]. Par exemple, nous avons démontré que le temps de bullage est directement corrélé au pourcentage d'agrégats insolubles et que c'est pour un traitement thermique à 90 °C qu'une augmentation significative de la proportion d'agrégats insolubles retarde le plus la formation de la mousse. En accord avec nos résultats, Unterhalsberger *et al.* [10] ont rapporté que la présence des agrégats insolubles semble gêner la diffusion et par conséquent la formation de la mousse. Ces mêmes auteurs ont également affirmé que ce comportement pourrait s'expliquer par les propriétés spécifiques de ces agrégats, telles que leur taille, forme, régularité ou encore hydrophobicité de surface. Entre outre, Rullier *et al.* [11] ont montré que seule une proportion élevée d'agrégats solubles

(environ 90%) serait capable de retarder la formation de la mousse, bien que leur étude concerne uniquement la β -Lg pure et les agrégats solubles d'une taille inférieure à 197 nm.

Finalement, nous pouvons supposer l'existence de deux régimes différents de formation de la mousse par bullage : le premier, commun à toutes les solutions protéiques est attribué aux monomères de protéines, tandis que le second régime est spécifique aux solutions traitées thermiquement et peut être attribué aux agrégats protéiques. Dans les conditions choisies, le premier régime prévaut au début du bullage dans tous les cas, mais se maintient jusqu'à la fin de celui-ci seulement pour les solutions de WPI natives, ce qui conduit à des mousses sèches. Suite à un traitement thermique à 80 °C ou plus, une bifurcation apparaît au cours du bullage, conduisant au second régime, ce qui a pour conséquence la formation de mousses humides avec un taux de foisonnement plus faible. Par conséquent, ce travail a clairement montré que les propriétés moussantes des protéines sériques ne sont pas affaiblies par le traitement thermique si l'obtention de mousses humides constitue le but recherché et pour une proportion maximale de 5% d'agrégats insolubles.

CONCLUSIONS

Nos résultats expérimentaux nous ont permis de démontrer que les quantités respectives d'agrégats solubles et insolubles formés peuvent être contrôlées par la température appliquée lors du traitement thermique des solutions de WPI. Par exemple, lorsqu'un traitement thermique à des températures « douces » (à 80 °C et 90 °C) est appliqué, la formation d'agrégats solubles qui ont ensuite tendance à s'agglomérer pour former des agrégats insolubles est favorisée. En revanche, lorsqu'une température « haute » de dénaturation (à 100 °C, par exemple) est appliquée, un très grand nombre de petits agrégats sont formés simultanément, mais ensuite, ces agrégats sont assez stables, ce qui signifie que leur croissance et leur agglomération est restée limitée, ce qui a eu pour conséquence de réduire la proportion d'agrégats insolubles.

Plus généralement, ces résultats donnent accès à une meilleure compréhension du comportement des WPI face au phénomène d'agrégation suite à un traitement thermique dynamique et ils s'avèrent donc d'une grande importance pour l'industrie alimentaire en raison de l'application très vaste des WPI dans la fabrication des mousses alimentaires telles que les crèmes fouettées et glacées, ainsi que dans l'ensemble des desserts lactés. En effet, ils permettent de mieux comprendre le rôle des agrégats sur la formation et la stabilisation de ces mousses, ainsi que de déterminer les conditions optimales d'agrégation des WPI pour ces processus. En revanche, en ce qui concerne les propriétés moussantes des protéines, les mécanismes permettant de former des mousses très stables grâce à la présence des agrégats protéiques ne sont encore ni bien compris, ni bien décrits dans la littérature. En particulier, les questions restent nombreuses sur le rôle joué aux interfaces par les assemblages de type agrégats protéiques, notamment l'effet de leur concentration et de leurs caractéristiques morphologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cayot, P., Lorient, D.: *Structures et technofonctions des protéines du lait*, Lavoisier Technique et Documentation, Paris, **1998**;
2. Clark, A.H.: Gelation of globular proteins, in: *Functional Properties of Food Macromolecules*, (Editors: Hill, S.E., Ledward, D.A., Mitchell, J.R.), 2nd ed., Aspen Publishers, Gaithersburg, USA, 1998, p.77;
3. Clark, A.H., Kavanagh, G.M, Ross-Murphy, S.B.: Globular protein gelation – theory and experiment, *Food Hydrocolloids*, **2001**, **15**, 383–400;
4. Gosal, W.S., Ross-Murphy, S.B.: Globular protein gelation, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2000**, **5**, 188–194;
5. Gaucheron, F.: Minéraux et produits laitiers, Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris, **2003**;
6. Damodaran, S: Protein stabilization of emulsions and foams, *Journal of Food Science*, **2005**, **70**, 54–66;
7. Zhu, H., Damodaran, S.: Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **1994**, **42**, 846–855;
8. Morr, C.V., Josephson, R.V.: Effect of calcium, N-ethyl maleimide and casein upon heat-induced whey protein aggregation, *Journal of Dairy Science*, **1968**, **51**, 1349–1355;
9. Barlow, I.E., Hardham, J.F., Zadow, J.G.: Stability of reconstituted whey protein concentrates to ultra-heat treatment processing, *Journal of Food Science*, **1984**, **49**, 32–33;
10. Unterhalsberger, G., Schmitt, C., Sanchez, C., Appolonia-Nouzille, C., Raemy, A.: Heat denaturation and aggregation of β -lactoglobulin enriched WPI in the presence of arginine HCl, NaCl and guanidinium HCl at pH 4.0 and 7.0, *Food Hydrocolloids*, **2006**, **20**, p.1006–1019;
11. Rullier, B., Novales, B. & Axelos, M.: Effect of protein aggregates on foaming properties of β -lactoglobulin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2008**, **330**, 96–102.