

Afslutningsrapport

Effekt af høje hydrostatiske tryk på valleproteiners
konformation, hydrolyse og geldannelse

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-28

December 1999



mejeriforeningen

danish dairy board

Slutrapport til Mejeribrugets Forskningsfond for projektet

**Effekt af høje hydrostatiske tryk på valleproteiners konformation,
hydrolyse og geldannelse**

Leif Skibsted
Karsten B. Qvist
Karsten Olsen
Henrik Stapelfeldt
Kristian R. Kristiansen

Mejeri- og Levnedsmiddelinstitutet
Levnedsmiddelkemi og Mejeriområdet
Den Kgl. Veterinær-og Landbohøjskole
Frederiksberg
1999

1. Sammendrag

Mælkeproteinet β -lactoglobulin, der er allergent, er fundet at være det måske mest trykfølsomme levnedsmiddelprotein overhovedet. Da β -lactoglobulin samtidig mængdemæssigt er det vigtigste valleprotein – og i øvrigt har gode ernæringsmæssige egenskaber – ligger der store udfordringer i at udnytte den nye skånsomme højtryksteknologi til at modificere β -lactoglobulins funktionelle egenskaber gennem trykpåvirkning. Trykdenaturering af β -lactoglobulin blev fundet at forløbe gennem tre stadier: (i) dannelse af en reversibel initial ”tryksmeltet” tilstand op til 50 MPa, hvor thiolgrupper bliver mere reaktive bl.a. som antioxidanter, og hvor bindingen af hydrophobe molekyler i proteinets indre hæmmes; (ii) en reversibel ”trykudfoldning” svarende til en mindskelse af proteinets volumen på 73 mL/mol og halvdenaturering ved 123 MPa, efterfulgt af (iii) en irreversibel denaturering og aggregering ved højere tryk, hvor også intermolekylære disulfidbindinger får betydning. Vandbindingen øges tilsyneladende ved den reversible trykdenaturering, idet β -lactoglobulins partielle molære volumen øges, men det bundne vand ”fylder” mindre end det frie vand, og den samlede volumenændring er derfor negativ.

Ved den reversible denaturering er hydrophobe dele af β -lactoglobulin ved fluorescensspektroskopi fundet at blive eksponeret til overfladen, hvilket giver anledning til aggregering og efterfølgende geldannelse bl.a. ved opvarmning. Disse termisk inducerede geler af trykdenatureret β -lactoglobulin er ved størrelseskromatografi fundet at have en størrelsesfordeling af aggregater, der ændrer sig ved henstand mod en større diversitet i partikelstørrelse.

Trykdenaturering øger β -lactoglobulins enzymatiske hydrolyserbarhed. Hydrolyse af β -lactoglobulin, hvorved proteinets allergene egenskaber forsvinder, er for trypsin fundet at kunne beskrives inden for Michaelis-Menten formalismen. Aktiveringsbarrieren for hydrolysen mindskes væsentligt (omkring $60 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ved β -lactoglobulins binding til enzymet, hvorved hydrolysehastigheden øges. Når trypsin (og andre proteolytiske enzymer) alligevel ikke er effektive over for β -lactoglobulin, skyldes det en yderst svag binding til enzymet. Tryk påvirker imidlertid denne binding af β -lactoglobulin til trypsin, og den øgede

hydrolysehastighed har kunnet beskrives som en mindskelse af volumen ved binding af substrat til enzym.

Disse resultater opnået gennem en kombination af metoder vil kunne danne grundlag for design af processer, hvorved valleproteiners funktionelle egenskaber og allergenicitet kan ændres.

2. Abstract

The milk protein β -lactoglobulin which is allergenic was found to be probably the most pressure sensitive among food proteins. As β -lactoglobulin quantitatively is the most important whey protein, and also from a nutritional point of view is a very valuable protein, it is a challenge to explore the new high pressure technology to modify β -lactoglobulins functional properties. Pressure denaturation of β -lactoglobulin was found to proceed through three steps: (i) formation of an initial and reversible "pressure melted" state from up to 50 MPa, during which the thiol groups are becoming more and more reactive, also as antioxidants, and during which hydrophobic molecules are bound less efficient in the interior of the protein; (ii) a reversible pressure "unfolding" corresponding to a reduction in protein volume of 73 mL/mol and a half-denaturation around 123 MPa, followed by (iii) an irreversible denaturation and aggregation at higher pressure, where also intermolecular disulfide bonds seem to be of importance. Water binding increases apparently during the reversible pressure denaturation, since the partial molar volume of β -lactoglobulin is increased. However, the bound water occupies less volume compared to the non-bound water, and the overall change in volume is accordingly negative.

During the reversible pressure denaturation, hydrophobic areas of β -lactoglobulin was found using fluorescence spectroscopy to be more exposed to the protein surface, in effect leading to aggregation followed by gel-formation upon mild heating. β -lactoglobulin was found by size exclusion chromatography to have a size distribution of particles in such gels, which changed with time towards a larger diversity.

Pressure denaturation increases the susceptibility of β -lactoglobulin to hydrolysis. Hydrolysis of β -lactoglobulin, by which process the allergenicity of the protein disappears has for trypsin found to fit into the Michaelis-Menten formalism. The energy barrier for hydrolysis of β -lactoglobulin was found to be reduced significantly (estimate of $60 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) through the binding of β -lactoglobulin to the enzyme, in effect increasing the rate of hydrolysis. However, trypsin (and other proteolytic enzymes) are still ineffective in hydrolyzing β -lactoglobulin, due to a weak binding of β -lactoglobulin to the enzyme. Pressure increases this binding of β -lactoglobulin to trypsin and the increased rate of hydrolysis was described to result from a reduced volume through binding of the substrate to the enzyme.

Together these results, which were obtained through a combination of experimental methods, should at least partly provide the background for design of processes by the use of which, the functional properties and the allergenicity of β -lactoglobulin should be modified.

3. Formål

Projektets formål har været at udvikle metoder til undersøgelse af høje tryks indflydelse på mælkeproteiner, og at anvende disse til en kvantitativ karakterisering af valleproteiners konformationsændring ved trykpåvirkning og de heraf ændrede egenskaber med hensyn til geldannelse, tilgængelighed for proteolytiske enzymer, vandbindingsevne og andre funktionelle egenskaber. Hensigten har yderligere været at opnå en detaljeret indsigt i mekanismen for β -lactoglobulins trykdenaturering for at forstå samspillet mellem det udfoldede proteins struktur og dets følsomhed overfor enzymatisk hydrolyse. Viden af denne type vil være en forudsætning for en fremtidig rationel udnyttelse af højtryksteknologien i dansk mejeribrug.

4. Baggrund

Valleproteiner har en høj næringsværdi og gode funktionelle egenskaber, hvilket danner grundlag for en omfattende industriel produktion af valleproteinisolater og -koncentrater. β -lactoglobulin er det vigtigste valleprotein i komælk, omend dets fysiologiske og ernæringsmæssige funktion stadig næppe er fuldt forstået. Proteinet er meget stabilt overfor enzymatisk hydrolyse ved atmosfærisk tryk, men selektiv fjernelse af β -lactoglobulin kan opnås ved at udnytte proteinets trykfølsomhed, da proteinet under forholdsvis moderate tryk ændrer konformation og udfoldes, og dermed bliver mere tilgængelig for hydrolyse med proteolytiske enzymer. Trykdenatureringen af β -lactoglobulin giver således mulighed for at formindske proteinets allergenicitet ved enzymatisk hydrolyse under milde betingelser ved fremstilling af for eksempel modermælkserstatninger eller diætetiske specialprodukter.

Trykfølsomheden af β -lactoglobulin kan undersøges ved en række metoder, der på forskellig vis giver information om de strukturelle ændringer af proteinet under trykbehandlingen og indsigt i mekanismen bag trykudfoldningen.

Tidligere udførte *in situ* undersøgelser af proteinets egenfluorescens viste, at β -lactoglobulin ved trykpåvirkning ændrer konformation, idet tryptophansidekæderne eksponeres mod vandfasen, som indikeret af en rødforskydning af bølgelængden for dets emissionsmaksimum.

Ud fra en simpel et-trinsmodel for denatureringen har der således kunne beregnes et reaktionsvolumen, $\Delta V^0 = 98 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$ for trykudfoldningen svarende til halvdenaturering ved 110 MPa. Yderligere blev det påvist, at renatureringen af proteinet er forholdsvis langsom, hvilket tillod enzymatisk hydrolyse (med trypsin) efter trykbehandling og muliggør specifik hydrolyse med enzymer, der måtte være mindre trykfølsomme end β -lactoglobulin.

Proteolyse af β -lactoglobulin under høje tryk har indledningsvis kunnet karakteriseres ved bestemmelse af et tilsyneladende aktiveringsvolumen, ΔV^\ddagger , for pepsins hydrolyse af proteinet ved pH 2,5 - betingelser, der under normale forhold ikke er tilstrækkelige til at nedbryde proteinet. For praktisk anvendelse og eventuel design af reaktorer er det dog vigtigt at kende trykvirkningen på de enkelte enzymkinetiske parametre for at derved bestemme aktiveringsvolumen og reaktionsvolumen for substratomdannelsen og ikke mindst trykafhængigheden af substratbinding til enzymet.

Trykbehandling af β -lactoglobulin i opløsning med høje koncentrationer giver anledning til dannelse af proteingeler, der har bevaret deres aroma og farve, samtidig med at de er mere glatte og bløde og har større elasticitet end varmeinducerede geler. En praktisk anvendelse af denne type gel, eventuelt fremstillet ved en kombination af tryk- og varmebehandling, afventer dog en bedre forståelse af mekanismen for den trykinducerede geldannelse.

5. Resultater

Gennemførelse af de forskelligartede undersøgelser i projektet forudsatte at der blev fremstillet en rigelig mængde ensartet og velkarakteriseret, nativt β -lactoglobulin (β -lg) af de genetiske varianter A og B af tilfredsstillende renhed som enzymsubstrat og forsøgsmateriale til de øvrige undersøgelser. Der blev indsamlet mælk fra køer, homozygote i hhv. β -lg A og B, og ved ionbytningsskromatografi af UF-koncentreret syrevalle fremstilledes to portioner på hhv. 460 g rent β -lg-A og 600 g rent β -lg-B. Karakteriseringen af de to portioner viste, at der var opnået præparater uden påviselige proteinforureninger og uden væsentlig denaturering af β -lg. (Kristiansen *et al.*, 1998).

5.1 Mekanisme for trykdenaturering af β -lactoglobulin

Mekanismen bag trykudfoldningen og geldannelse blev undersøgt ved en række avancerede *in situ* fluorescensspektroskopiske teknikker. Ved undersøgelse af anisotropien af proteinets egenfluorescens var det muligt at bestemme trykfølsomheden med en metode, der ikke som det tidligere anvendte kvanteudbytte er følsom overfor diverse quenchemekanismer. Ved stigende tryk forøgedes depolariseringen af proteinets tryptophanfluorescens, svarende til, at den molekylære mobilitet af disse sidekæder forøgedes væsentligt. Reaktionsvolumenet bestemt ved denne teknik var $-73 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$, svarende til halv-denaturering ved 123 MPa. Ved anvendelse af fluorescensproberne ANS, der associeres til hydrofobe steder på proteinet, og *cis*-parinarsyre, der bindes i proteinets indre kavitet, blev det konstateret, at trykpåvirkning forøgede proteinets hydrofobicitet (i god overensstemmelse med blotlægningen af tryptophansidekæder) og forårsagede en udfoldning, så den anvendte probe ikke længere blev bundet i proteinets indre.

På basis af litteraturen og resultaterne af undersøgelserne i projektet har vi til erstatning for den tidligere anvendte et-trinsmodel derfor foreslået følgende mekanisme for β -lactoglobulin's trykdenaturering (Stapelfeldt & Skibsted, 1999):

1. Moderat tryk (op til 50 MPa) inducerer ændringer i β -lactoglobulin, karakteriseret som en "smeltning", der forøger reaktiviteten af den "frie" thiolgruppe (Cys-121) og inducerer kollaps af kaviteten i proteinets indre uden dog at forøge proteinets volumen.
2. Ved højere tryk (op til 200 MPa) sker der en udfoldning (reaktionsvolumen $-73 \text{ mL}\cdot\text{mol}^{-1}$), der efter ophør af trykpåvirkningen i hvertfald er delvis reversibel med langsom renaturering.
3. Ved højere tryk får irreversible ændringer stigende betydning, og aggregering og geldannelse indtræder. Her bidrager intermolekylære svovlbindinger væsentligt.

Med henblik på bedre at kunne undersøge proteinudfoldningen *in situ*, er β -lactoglobulin blevet mærket med fluorescensproben MIANS, der skulle være følsom for ændringer i solventpolaritet og kan anvendes til studier af strålingsløs energioverførsel fra såvel proteinets tryptophansidekæder som andre fluorescensprober (Stapelfeldt *et al.* 1999). Mærknings- og oprensingsproceduren for β -lactoglobulin er publiceret, ligesom fluorophoren er

karakteriseret m.h.t. fluorescenskvanteudbytte og -levetid. Maleimid-baserede prober som MIANS regnes for næsten specifikke overfor thiolgrupper, og MALDI-TOF massespektroskopi viste da også, at kun ét MIANS-molekyle blev kovalent bundet per proteinmonomer. Foreløbige undersøgelser har ligeledes vist, at kvanteudbyttet målt *in situ* har minimum ved 50 MPa, svarende til den ”tryksmeltede” tilstand, for hvilken thiolreaktiviten stiger og hvor β -lactoglobulin får væsentlig antioxidativ effekt.

Mens tidligere undersøgelser af renatureringen bestemt ved thiolgruppens reaktivitet viste, at renatureringen efter tryk ikke udviste nogen væsentlig temperaturafhængighed, har endnu ikke-publicerede resultater vist, at selve trykudfoldningen målt *in situ* viser forskellig trykprofil ved forskellig temperatur. Disse resultater er under bearbejdelse, men signalerer trykdenatureringens kompleksitet og indikerer, at en mere fyldestgørende (pH, temp, tryk)-profil for trykdenatureringen vil give mulighed for at designe mejeriteknologiske processer ved at kombinere forskellige tryk- og temperaturbetingelser for at opnå specifikke egenskaber af valleproteiner.

Trykdenaturering af β -lactoglobulin (og andre proteiner) forudsætter, at det denaturerede protein fylder mindre end det native. For globulære proteiner som β -lactoglobulin synes det umiddelbart overraskende, at det udfoldede protein fylder mindre end det ”sammenrullede” ikke-denaturerede protein. Dette tilsyneladende paradoks er relateret til proteinets vandbinding, idet volumenændring i forbindelse med ændret vandbinding af proteinet indgår i den overordnede ligevægtsbetragtning. Da vandbinding yderligere er af central betydning for proteingelers egenskaber, blev volumenforholdene ved trykdenaturering undersøgt ved en direkte metode baseret på nøjagtig bestemmelse af proteinopløsningers massefylde. Det lykkedes at få etableret den såkaldte densitometriske metode til bestemmelse af valleproteiners partielle molære volumener. Begge genetiske varianter øger voluminet ved trykbehandling, idet dog β -variantens voluminen midlertidigt mindskes forud for volumenøgningen. Det er bemærkelsesværdigt, at denne volumenøgning kunne bestemmes direkte, og det vil efterfølgende give mulighed for, ud fra forskellen til det negative reaktionsvolumen, at beregne ændringen i vandbinding under trykdenaturering. Blokering af thiolgrupperne, der indgår i trin tre i trykdenatureringen, medførte ikke kvalitative ændringer i volumenændringerne under trykdenaturering ved 1500 atm., hvilket yderligere bekræfter

betydningen af hydrofob interaktion fremfor irreversibel aggregering ved dette moderate høje tryk. (Olsen & Skibsted, to be published)

5.2 Enzymkinetik for hydrolyse af β -lactoglobulin under tryk

Hydrolyse af β -lactoglobulin med trypsin blev indledningsvis udført for en kommerciel blanding af A og B-varianterne, repræsentativ for et normalt valleproteinpræparat, ved atmosfærisk tryk og under steady-state betingelser. Det bemærkes, at analysen af β -lactoglobulins hydrolyse med trypsin indenfor den formelle Michaelis-Menten kinetik er den første egentlige beskrivelse af dette vigtige valleproteins enzymatiske hydrolyse, hvor også temperatureffekter kvantiseres. Bestemmelse af ikke-hydrolyseret β -lactoglobulin blev foretaget vha. kapillarelektroforese og dannede grundlag for beregning af initialhastighederne for hydrolysen. De enzymkinetiske parametre blev udledt fra en Michaelis-Menten analyse af hastigheder ved forskellig temperatur, hvorefter de termodynamiske parametre, aktiveringsenergi og bindingsenthalpi, for trypsinkatalyseret hydrolyse af β -lactoglobulin kunne bestemmes til henholdsvis $E_a = 51 \pm 18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ og $\Delta H_{\text{bind}} = -28 \pm 4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Samlet ses det, at trypsinhydrolyse af β -lactoglobulin forøges ved at sænke energibarrieren med $60 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ sammenlignet med syrekatalyseret hydrolyse. Den fulde effekt af stabiliseringen bliver dog delvist modvirket af en relativ svag binding af proteinet til enzymet (Olsen *et al.* 1999b)

Trykinduceret *in-situ* hydrolyse af β -lactoglobulin udført under steady-state kinetiske betingelser og med trypsin som enzym blev ligeledes analyseret vha. kapillarelektroforese. Kvantiseringen af ikke-hydrolyseret β -lactoglobulin i de trykbehandlede prøver var dog væsentlig vanskeligere end i ovennævnte forsøg pga. udpræget grad af proteinaggregering efter trykbehandlingen. Således blev der udviklet en ny analysemetode baseret på en prøveforbehandling i 8 M urinstof og 20 mM dithiothreitol samt elektroforese med en 6 M urinstof-phosphat runbuffer, hvilket gav acceptable resultater. Hydrolysen af β -lactoglobulin blev bestemt som funktion af tryk, tid og proteinkoncentration og analyseret ifølge Michaelis-Menten kinetik for hvert tryk. De sidste resultater er under endelig bearbejdelse, men forståelsen af den trykinducerede forøgelse af hydrolysen er dog tydelig set ud fra

enzymkinetiske parametre trykafhængighed. I forhold til atmosfærisk tryk øges hydrolysen af β -lactoglobulin med trypsin med trykket op til 100 MPa, hvorefter substratdannelsen ikke øges yderligere ved højere tryk. Dette kan enten skyldes trykinduceret aggregering af proteinet, der gør det vanskeligere for trypsin at hydrolysere β -lactoglobulin, eller at substratet ved trykdenatureringen bindes mere effektivt til enzymet. Faktisk viser trykafhængigheden af substratbindingen, at β -lactoglobulin bindes signifikant bedre jo højere trykket er. Det betyder, at det fuldt denaturerede protein ($P \geq 150$ MPa) har flere effektive kontakter med trypsin, men til gengæld har enzym-substrat komplekset formodentlig en begrænset fleksibilitet når katalysen skal foregå.

5.3 Geldannelse af trykbehandlet β -lactoglobulin

Termisk geldannelse af trykbehandlet β -lactoglobulin er undersøgt mhp. at ændre de funktionelle egenskaber af valleproteiner. Resultaterne viser, at henstandstiden efter trykbehandlingen har stor indflydelse på både geltiden og styrken af de opnåede geler. Således forringes geldannelsesevnen, når β -lactoglobulin udsættes for tryk op til 300 MPa, hvilket yderligere forstærkes ved henstand i 24 timer ved 5 °C. Størrelseskromatografi af trykbehandlede prøver efter 24 timers henstand udviste en rimelig god invers korrelation mellem trykintensiteten, fordelingen af polymerer og de reologiske egenskaber. Med stigende tryk øges geltiden og gelstyrken nedsættes. (Olsen *et al.* 1999a)

En egentlig trykinduceret geldannelse er undersøgt for et kommercielt valleproteinisolat og ren β -lactoglobulin. Lavmolekylære proteinbestanddele synes at have stor indvirkning på de dannede gellers styrke.

5.4 Samlet konklusion

Trykfølsomheden af det kvantitativt vigtigste valleprotein, β -lactoglobulin, er beskrevet kvantitativt og den trykinducerede denaturering er vist at bestå af tre trin. Efterfulgt af en indledende "tryksmeltning" sker en reversibel trykdenaturering, hvor den enzymatiske hydrolyse af det allergene protein øges på grund af en mere effektiv binding af substratet til

enzymet. Ved tredje trin sker en ikke reversibel associering som indledning til trykinduceret geldannelse.

6. Publikationer

6.1 Internationale tidsskrifter

1. Stapelfeldt, H.; Olsen, C.E. & Skibsted, L.H. (1999) Spectrofluorometric characterization of β -lactoglobulin B covalently labeled with 2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6-sulfonate. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3986-3990.
2. Stapelfeldt, H. & Skibsted, L.H. (1999) Pressure denaturation and aggregation of β -lactoglobulin as studied by fluorescence depolarization, Rayleigh scattering, radiationless energy-transfer and hydrophobic fluoroprobing. *J. Dairy Res.* **66**, 545-558.
3. Kristiansen, K.R., Otte, J., Ipsen, R., Qvist, K.B. (1998) Large scale preparation of β -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion exchange chromatography. *Int. Dairy J.* **8** 113-118.
4. Olsen, K.; Otte, J. ; Qvist, K.B.; Ipsen R. & L.H. Skibsted (1999a) Thermal gelation of high-pressure treated β -lactoglobulin. *Milchwissenschaft* **54**, 543-546.
5. Olsen, K.; Otte, J. & L.H. Skibsted (1999b) Steady-state kinetics and thermodynamics of the hydrolysis of β -lactoglobulin by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, indsendt manuskript.

6.2 Posters på kongresser mv.

6. Olsen, K.; Stapelfeldt, H. og Skibsted, L.H.: Effekt af høje hydrostatiske tryk på β -lactoglobulins hydrolyse under steady-state betingelser. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, KVL, 30.-31. januar 1997.
7. Kristiansen, K.R.& Qvist, K.B. Large scale preparation of pure native β -lactoglobulin. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, KVL, 30-31. januar 1997.
8. Olsen, K.; Stapelfeldt, H. & Skibsted, L.H.: High-pressure induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin B. Poster præsenteret på 'Prospects for new applications of whey proteins', MADGELAS Workshop, Lund, 29-30. september 1997.
9. Olsen, K.; Stapelfeldt, H. & Skibsted, L.H.: Effekt af høje hydrostatiske tryk på valleproteiners konformation, hydrolyse og geldannelse. Præsenteret på Mejeriforskningsdagen, Århus, 7/11-1997.

10. Kristiansen, K.R., Otte, J., Ipsen, R., Qvist, K.B.: Large scale preparation of pure, native β -lactoglobulin A and B. Poster ved Mejeriforskningsdagen, Århus, 7/11-1997.
11. Olsen, K.; Otte, J.; Skibsted, L.H.; Qvist, K.B. & Ipsen, R.: Reologiske målinger af termisk geldannelse af β -lactoglobulin behandlet med høje hydrostatiske tryk. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, DTU, 29-30. januar 1998.
12. Olsen, K.; Skibsted, L.H.; Qvist, K.B. & Kristiansen, K.R.: Effekt af høje hydrostatiske tryk på hydrolyse af β -lactoglobulin. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, DTU, 29-30. januar 1998.
13. Kristiansen, K.R.; Olsen, K.; Otte, J.; Qvist, K.B. & Skibsted, L.H.: Capillary electrophoresis for determination of native and denatured β -lactoglobulin in samples treated by high hydrostatic pressure. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, DTU, 29-30. januar 1998.
14. Kristiansen, K.R.; Olsen, K.; Qvist, K.B. & Skibsted, L.H.: Determination of unhydrolysed β -lactoglobulin in high pressure treated samples. Poster. International Dairy Congress, Århus, 1998.
15. Olsen, K.; Otte, J.; Qvist, K.B.; Ipsen, R. & Skibsted, L.H.: Thermal gelation of high-pressure treated β -lactoglobulin. Poster at IVth joint meeting of Japanese and European Seminars on High Pressure Bioscience and Biotechnology. Heidelberg, Tyskland, 30/8-3/9 1998.
16. Olsen, K.; Kristiansen, K.R.; Qvist, K.B. & Skibsted, L.H.: Enzymatisk nedbrydning af β -lactoglobulin under høje hydrostatiske tryk. Poster. LMC's Levnedsmiddelkongres, KVL, 28-29. januar 1998.
17. Olsen, K., Kristiansen, K.R.; Qvist, K.B. & Skibsted L.H.: Enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin under high pressure. Præsenteret på Dansk Bioteknologisk Konference, Munkebjerg, Vejle, 20-21. maj 1999.

6.3 Faglige artikler

Stapelfeldt, H. & Skibsted, L.H. (1997): Levnedsmidler under høje tryk. *Food Market Norden*, **3(4)**, 24.

Stapelfeldt, H. & Skibsted, L.H. (1998): Højtryksbehandling som levnedsmiddeltechnologisk proces. *Mælkeritidende*, **111**, 82-83.

6.4 Mødeindlæg

Olsen, K.: Effect of high pressure on lactoglobulin. Indlæg ved NorFA sponsored workshop on Milk Proteins - Structure and Functional Properties, Naantali, Finland, 28-30/11 1998.

Kristiansen, K.R.: Large scale preparation of β -lactoglobulin A and B by ultrafiltration and ion-exchange chromatography. Indlæg ved 'Prospects for new applications of whey proteins', MADGELAS Workshop, Lund, 29-30/9 1997.

7. Forskeruddannelse

Rikke Ege Møller og Jørgen Dissing har som del af levnedsmiddelstudiet ved KVL udarbejdet et kandidatprojekt med relation til projektet. Endvidere har Nanna Borne og Peter Kristensen udarbejdet et bachelorprojekt i projektets regi.

8. Samarbejdsrelationer

I forbindelse med projektet har vi taget kontakt og besøgt prof. Dietrich Knorr og hans gruppe på Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin University of Technology med henblik på samarbejde indenfor højtrykforarbejdning af levnedsmiddelsystemer.

