

INFLUENCE OF LOW-TEMPERATURE HEATING ON THE FRACTIONAL COMPOSITION OF MILK WHEY PROTEINS

V. Yukalo, K. Datsyshyn, V. Soltys

Ternopil Ivan Puluj National Technical University

Key words:

Milk whey proteins
Fractional composition
Heating

Article history:

Received 05.11.2024
Received in revised form
21.11.2024
Accepted 09.12.2024

Corresponding author:

K. Datsyshyn

E-mail:

katkostyuk3103@gmail.com

Citation: Юкало В. Г., Да-
цишин К. Є., Солтис В. П.
(2024). Вплив низькотем-
пературного нагрівання
на фракційний склад біл-
ків сироватки молока.
Наукові праці НУХТ,
30(6), 149—158.

DOI: 10.24263/2225-
2924-2024-30-6-15

ABSTRACT

The discovery of a large number of bioactive proteins and peptides in milk by the methods of modern proteomics requires the need to review the influence of various technological factors on their biological action. One of such factors widely used in the technology of milk and dairy products is heating. Significant changes in the functional properties of milk proteins are caused by heating it to temperatures above 55—60 °C. However, heating at lower temperatures can affect the biological activity of milk proteins and peptides. This primarily concerns whey proteins, as caseins are resistant to heat. Therefore, the goal of our research was to find out the effect of short-term heating of milk whey at temperatures of 40 °C and 50 °C on the fractional composition of proteins. Whey for the research was isolated from skimmed milk with an acidity of 18 °T after isoelectric precipitation of casein at pH 4.6. Analysis of the fractional composition of whey proteins was performed using analytical disc-electrophoresis in native conditions. Comparative analysis of whey proteins was performed by express electrophoresis in polyacrylamide gel plates. Changes in the molecular weight of whey proteins were studied by gel filtration on columns with Sephadex G-25 and G-75. It was found that short-term (5 min) heating of milk whey to 40 °C at pH 4.6 did not affect the qualitative and quantitative composition of protein fractions. A slight decrease in the share of immunoglobulins from 17.5±1.2% to 15.8±1.3% was within statistical error. When whey was heated to 50 °C, the proportion of undenatured whey protein decreased for 6.1±0.9%. According to the results of electrophoresis, this was mainly due to the decrease in the proportion of immunoglobulins from 17.5±1.2% to 13.3±1.1%. Gel filtration on Sephadex G-75 showed a decrease in the proportion of proteins with molecular weights greater than 80 000 Da. This may be due to the breakdown of β -lactoglobulin octamers, which are formed at a pH value of 4.6.

ВПЛИВ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО НАГРІВАННЯ НА ФРАКЦІЙНИЙ СКЛАД БІЛКІВ СИРОВАТКИ МОЛОКА

В. Г. Юкало, К. Є. Дацишин, В. П. Солтис

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

Відкриття великої кількості біоактивних білків і пептидів у молоці методами сучасної протеоміки вимагає необхідності переглянути вплив різних технологічних факторів на їх біологічну дію. Одним із таких факторів, що широко використовуються в технології молока і молочних продуктів, є нагрівання. Помітні зміни у функціональних властивостях білків молока спричиняють його нагрівання до температур вище 55—60 °С. Проте нагрівання при нижчих температурах може впливати на біологічну активність білків і пептидів молока. Насамперед це стосується білків сироватки молока, оскільки казеїни є стійкими до нагрівання, тому метою нашого дослідження було з'ясування впливу короткотермінового прогрівання молочної сироватки при температурі 40 °С і 50 °С на фракційний склад білків.

Сироватку для дослідження виділяли зі знежиреного молока кислотністю 18 °Т після ізоелектричного осадження казеїну при значенні рН 4,6. Аналіз фракційного складу білків сироватки проводили з використанням аналітичного диск-електрофорезу в нативних умовах. Порівняльний аналіз білків сироваток проводили експрес-електрофорезом у пластинках поліакриламідного гелю. Зміни в молекулярних масах білків сироватки досліджували гель-фільтрацією на колонках з сефадексами G-25 і G-75. Встановлено, що короткотривале (5 хв) прогрівання молочної сироватки до 40 °С при значенні рН 4,6 не впливає на якісний і кількісний склад білкових фракцій. Незначне зменшення частки імуноглобулінів з $17,5 \pm 1,2\%$ до $15,8 \pm 1,3\%$ в межах статистичної похибки. При прогріванні сироватки до 50 °С зменшується частка неденатурованого білка сироватки на $6,1 \pm 0,9\%$. За результатами електрофорезу це відбувається переважно завдяки зменшенню частки імуноглобулінів з $17,5 \pm 1,2\%$ до $13,3 \pm 1,1\%$. Гель-фільтрація на сефадексі G-75 показала зниження частки білків з молекулярними масами більше 80 000 Да. Можливо, це пов'язано з розпадом октамерів β -лактоглобулінів, які утворюються при значенні рН 4,6.

Ключові слова: білки сироватки молока, фракційний склад, нагрівання.

Постановка проблеми. Методами сучасної протеоміки в сироватці коров'ячого молока відкрито близько тисячі різних білків і поліпептидів. Для багатьох з них встановлені біологічні функції, що дає змогу по-новому сформулювати поняття біологічної цінності для цих білків (Фох, 2015), тому актуальним є подальше дослідження дії такого важливого фактора, який впливає на структуру і біологічну активність білків, як нагрівання. Значна кількість наукових досліджень присвячена вивченню теплової денатурації білків сироватки. Проте вони переважно стосуються температур, що перевищують 60 °С, тоді як температури нижче 60 °С часто використовуються при переробці молока. Вони суттєво не впливають на функцію-

нальні властивості білків сироватки молока, але можуть змінювати їхню біологічну активність, тому важливим питанням залишається детальне вивчення механізмів впливу нагрівання в діапазоні температур до 60 °C на властивості і фракційний склад білків сироватки молока.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Білки сироватки молока більш гетерогенні, ніж казеїни, за своєю будовою, властивостями і функціями. Відповідно, процеси теплової денатурації в них мають різний перебіг. Окрім того, основні білки сироватки відносяться до глобулярних білків, і вони менш стійкі до теплової денатурації (Brodkorb, Croguennec, Bouhallab, & Kehoe, 2016; Guo, & Wang, 2019; Kelleher et al., 2020).

Денатурація білків сироватки молока проходить ступінчасто і починається вже при температурах близько 50 °C. Основними фракціями, які визначають загалом теплову денатурацію білків сироватки, є β -лактоглобулін (50% від білків сироватки) і α -лактальбумін (25%). Меншою мірою це стосується альбуміну сироватки крові (BSA), імуноглобулінів (IG), лактоферину (Lf) і лактопероксидази (Lp) (Deeth, & Bansal, 2019; Curlej, 2022). Властивості основних фракцій білків сироватки молока, які визначають їх стійкість до теплової денатурації наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Склад і властивості білків сироватки молока, адаптовано за (Bogahawaththa, & Vasiljevic, 2022)

Характеристика молекули білка, функціональна властивість	Фракція сироваткового білка			
	β -лактоглобулін	α -лактальбумін	Альбумін сироватки крові	Імуноглобулін G
Частка від всіх білків сироватки (%)	50	20	8	12
Молекулярна маса (Да)	18300	14200	66500	160000
Ізоелектрична точка	5,13	4,2—4,5	4,7—4,9	5,5—8,3
Кількість залишків цистеїну	5	8	35	
Кількість внутрішньо-молекулярних дисульфідних зв'язків	2	4	17	
Кількість вільних сульфгідрильних груп	1	0	1	
Вторинна структура	8%- α -спіралі 45%- β -структури	26%- α -спіралі 14%- β -структури	67%- α -спіралі 10%- β -згини	3%- α -спіралі 64%- β -структури
Нативна конформація	глобула	глобула	глобула	глобула
Початкова температура денатурації (°C)	78	62	64	72

Зважаючи на значний вміст (50%), не важко передбачити, що найбільше значення для денатурації білків має β -лактоглобулін. У його молекулі є вільна сульфгідрильна група. У молоді β -лактоглобулін перебуває у вигляді димерів. Димери зв'язані іонними зв'язками між карбоксильними групами аспарагінової і глутамінової кислоти однієї молекули та аміногрупами залишків лізину іншої молекули. У мономерному стані β -лактоглобулін перебуває, коли значення рН середовища менше ніж 3,5 і більше 7,5 β -лактоглобулін перебуває у вигляді октамерів. За літературними даними при температурах $<60^\circ\text{C}$ для β -лактоглобуліну характерна зворотна денатурація. Незворотна денатурація починається при досягненні температури 70°C і більше (Gezimati, Singh, & Creamer, 1996). До нагрівання більш стійкими є α -лактальбумін (Calvo, Leaver, & Banks, 1993). Його незворотна денатурація починається при 80°C . Найбільш чутливим до нагрівання є альбумін сироватки. Вже при 60°C настає його незворотна денатурація (Gezimati et al., 1996). Імуноглобуліни теж є чутливими до нагрівання і починають втрачати свою біологічну активність вже при 72°C (Marnila, & Korhonen, 2011; Anema, 2017).

У 2024 р. описані результати, які можуть свідчити, що при температурах близько 50°C може відбуватись незворотна денатурація білків сироватки молока (Yukalo, Datsyshyn, & Storozh, 2024). Такі зміни відбуваються завдяки β -лактоглобуліну і в меншій мірі альбуміну сироватки. Оскільки температури від 40°C до 50°C часто використовуються в технологічних процесах, важливим є більш детальне вивчення впливу таких температур на структуру і властивості білків сироватки молока.

Мета статті: встановити вплив короткотермінового прогрівання молочної сироватки при температурі 40°C і 50°C на фракційний склад білків.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання дослідження:

- отримати взірець молочної сироватки шляхом ізоелектричного осадження казеїну із знежиреного молока при 20°C ;
- охарактеризувати фракційний склад білків сироватки методом аналітичного диск-електрофорезу і гель-фільтрацією;
- провести короткотермінове прогрівання взірця молочної сироватки при 40°C і 50°C , встановити частку денатурованого білка, охарактеризувати фракційний склад білків прогрітої сироватки експрес-електрофорезом і гель-фільтрацією.

Матеріали і методи. Для виділення сировини використовували знежирене молоко кислотністю 18°T отримане з ПрАТ «Тернопільський молокозавод». Сироватку відділяли після осадження казеїнів в ізоелектричній точці при значенні рН 4,6, яке досягали додаванням гідрохлоридної кислоти. Осад казеїну відділяли центрифугуванням при 3 000 об/хв на центрифугі ОПН-8.

Концентрацію білків у сироватці, взірцях для електрофорезу і хроматографічних фракціях визначали за поглинанням при довжині хвилі $\lambda=280$ на спектрофотометрі СФ-46. Розрахунок концентрації білків сироватки проводили з використанням коефіцієнту поглинання ($D_{\text{cm}}^{1\%}$): 12,3 (Fox, 2015).

Для характеристики фракційного складу білків виділеної сироватки використовували аналітичний диск-електрофорез для нейтральних і кислих білків (Yukalo, Datsyshyn, Krupa, & Storozh, 2024). Диск-електрофорез проводили в трубочках поліакриламідного гелю (ПАГ) на апараті фірми «Reanal» (Угорщина).

Для порівняння фракційного складу білків виділеної сироватки і сироватки після прогрівання при 40 °С і 50 °С проводили експрес-електрофорез в пластинках ПАГ (Yukalo, Datsyshyn, & Storozh, 2019). Кількісну обробку електрофореграм проводили з використанням функції зчитування графічних зображень imread (Yukalo et al., 2024).

Розподіл білків і пептидів сироваток за молекулярними масами визначали гель-фільтрацією. Гель-фільтрацію проводили на колонках системи для рідинної хроматографії фірми «Reanal» (Угорщина). Для цього використовували сефадекси G-25 і G-75 фірми «Pharmacia» (Швеція).

Математично-статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням пакетів програм Microsoft Office Excel 2007.

Результати і обговорення. Для вивчення впливу нагрівання на першому етапі дослідження було виділено сироватку при температурі 20 °С і значенні рН 4,6. При цьому до знежиреного молока додавали при помішуванні 1Н гідрохлоридну кислоту. Денатурований казеїн осаджували центрифугуванням на центрифугі ОПН-8 15 хв при 5 000 об/хв. З отриманої таким чином сироватки відбирали зріз (контрольний) для електрофоретичного і хроматографічного аналізу білкового складу. Серед електрофоретичних методів був вибраний вискоєфективний аналітичний диск-електрофорез у трубочках поліакриламідного гелю в нативних умовах для нейтральних і слабкокислих білків. Цей метод дає змогу ідентифікувати всі основні фракції білків сироватки молока (Yukalo, Datsyshyn, & Storozh, 2024). На рис. 1 показана електрофореграма виділеної контрольної сироватки.

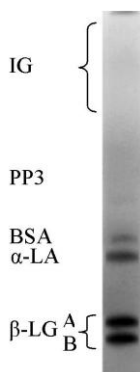


Рис. 1. Електрофореграма сироватки молока після відділення казеїну при рН 4,6:

β-Ig – β-лактоглобулін; α-la – α-лактальбумін; BSA – альбумін сироватки;

PP3 – протеозо-пептон 3; IG – імуноглобуліни

На електрофореграмі видно типове розділення білків сироватки молока в нативних умовах. Добре ідентифікуються імуноглобуліни, α-лактальбумін, альбумін сироватки крові, а також два генетичні варіанти (А і В) β-лактоглобуліну.

Для хроматографічного аналізу були вибрані два типи декстранового гелю з різними межами виключення за молекулярними масами: сефадекс G-25 (1 000—5 000 Да) і сефадекс G-75 (3 000—80 000 Да). Таке поєднання дає змогу аналізувати зміни молекулярних масах білків і поліпептидів в межах від 1 000 Да

до понад 80 000 Да (Юкало, & Дацишин, 2018). Результати гель-фільтрації контрольної сироватки на хроматографічних колонах з сефадексами G-25 і G-75 показані на рис. 2. У випадку сефадексу G-25 було отримано два піки. Перший пік включає білки і поліпептиди молекулярними масами більше 5000 Да, другий асиметричний пік включає пептиди з молекулярними масами близько 1000 Да. На колонці з сефадексом G-75 видно три піки. Перший пік складається з білків з молекулярною масою, яка перевищує або близька до 80000 Да. Третій пік включає пептиди і поліпептиди з масою близько 3000 Да і менше. Не дуже чіткий другий пік містить низькомолекулярні фракції (від 3000 до 80000 Да). Попередньо проведений електрофоретичний аналіз показав, що другий пік може містити β -Ig, α -la і BSA (Юкало, & Дацишин, 2018).

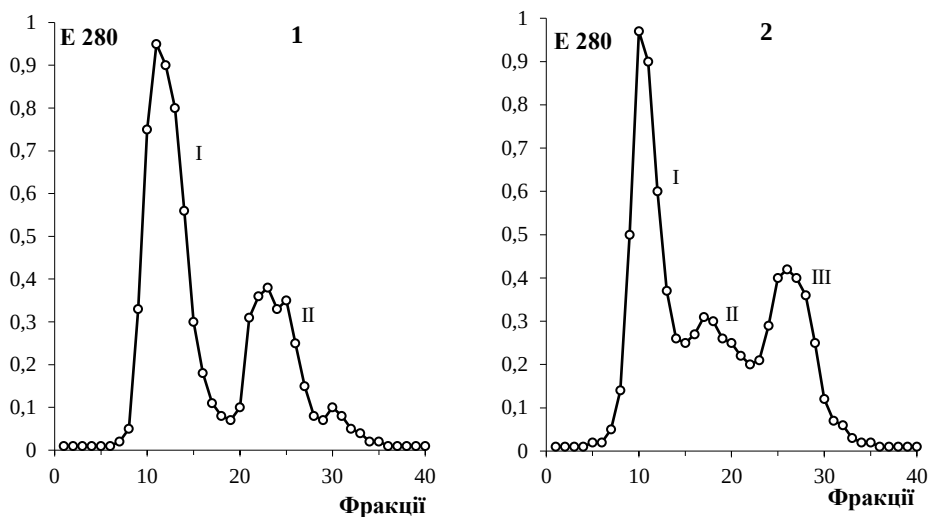


Рис. 2. Хроматограма контрольної сироватки, отримана в результаті гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-25 (1) і сефадексом G-75 (2)

Частину виділеної при 20 °С сироватки використали для вивчення впливу низькотемпературного нагрівання. Для цього один візріць нагрівали до 40 °С і витримували протягом 5 хв, а інший — до 50 °С і теж витримували 5 хвилин. Після цього візріці охолоджували до 20 °С і аналізували їх склад з допомогою електрофору та хроматографії.

Для проведення електрофору був вибраний експрес-метод, спеціально розроблений для порівняльного аналізу білків сироватки у пластинках поліакриламідного гелю (Yukalo et al., 2019). Результати електрофору показані на рис. 3. Якісний склад білкових фракцій всіх візріців сироватки однаковий. Всі ідентифіковані фракції присутні в кожному візріці. Відмінності можуть бути в кількісному складі. Для встановлення вмісту фракцій білків сироватки було проведено денситометрію доріжок кожного візріця в п'яти повтореннях. На основі денситограм

було розраховано вміст чотирьох основних фракцій: β -лактоглобуліну, α -лактальбуміну, альбуміну сироватки крові та імуноглобулінів. Результати наведені в табл. 2.

Незначні зміни вмісту встановлені для всіх фракцій. Найбільш суттєвими вони є у випадку імуноглобулінів. Їхній вміст зменшується зі збільшенням температури прогрівання. За літературними даними ця фракція є однією з найменш стійких до нагрівання (Wijayanti, Bansal, & Deeth, 2014; Wijayanti, Brodkorb, Hogan, & Murphy, 2019).

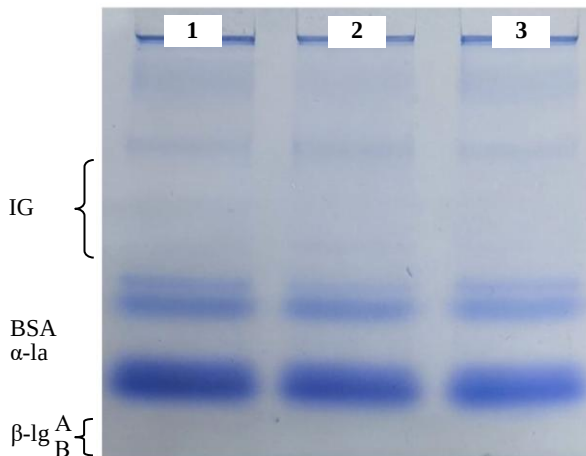


Рис. 3. Експрес-електрофорез взірців контрольної сироватки (1) і сироваток, прогрітих при 40 °С (2) і 50 °С (3)

Таблиця 2. Вміст основних білкових фракцій у контрольній сироватці і сироватці після короткочасного (5хв) прогрівання при 40 °С і 50 °С ($M \pm m$, $n=5$)

Вид сировини	Вміст білкових фракцій у сироватці			
	β -лактоглобулін	α -лактальбумін	Альбумін сироватки	Імуноглобуліни
Контрольна сироватка	39,2 $\pm$ 4,3	16,8 $\pm$ 2,0	9,9 $\pm$ 1,4	17,5 $\pm$ 1,2
Сироватка, прогріта при 40 °С	40,1 $\pm$ 4,0	17,2 $\pm$ 1,9	10,0 $\pm$ 1,4	15,8 $\pm$ 1,3
Сироватка, прогріта при 50 °С	41,3 $\pm$ 3,9	18,0 $\pm$ 2,1	10,2 $\pm$ 1,3	13,3 $\pm$ 1,1

Не зовсім зрозумілою є тенденція до незначного підвищення вмісту інших трьох основних фракцій білків. Насамперед це стосується β -лактоглобуліну і α -лактальбуміну. Можливо, таке збільшення пов'язане зі зміною концентрації загального білка сироватки після прогрівання до 40 °С і 50 °С. Таке прогрівання вже може призвести до денатурації і втрати розчинності незначної частини білкових молекул (Mercadante et al., 2012). При підготовці взірців для електрофоретичного аналізу проводиться центрифугування і денатуровані білки осаджуються. В результаті частка термостійкіших білкових фракцій збільшується.

Взірці сироватки прогрітої при 40 °С і 50 °С аналізували гель-фільтрацією, тому що це було зроблено для контрольної сироватки. Отримані хроматограми на колонках з сефадексом G-25 і G-75 для взірця, прогрітого при 40 °С, практично не відрізнялись від хроматограм контрольної сироватки (рис. 2). Аналіз взірця, прогрітого при 50 °С, показав певні відмінності. При гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-25 видно незначні зміни у хроматографічному профілі піку II і перерозподіл низькомолекулярних фракцій (рис. 4(1)). Це стосується пептидів (близько 1000 Да), які елюються з об'ємом, що дорівнює повному об'єму колонки.

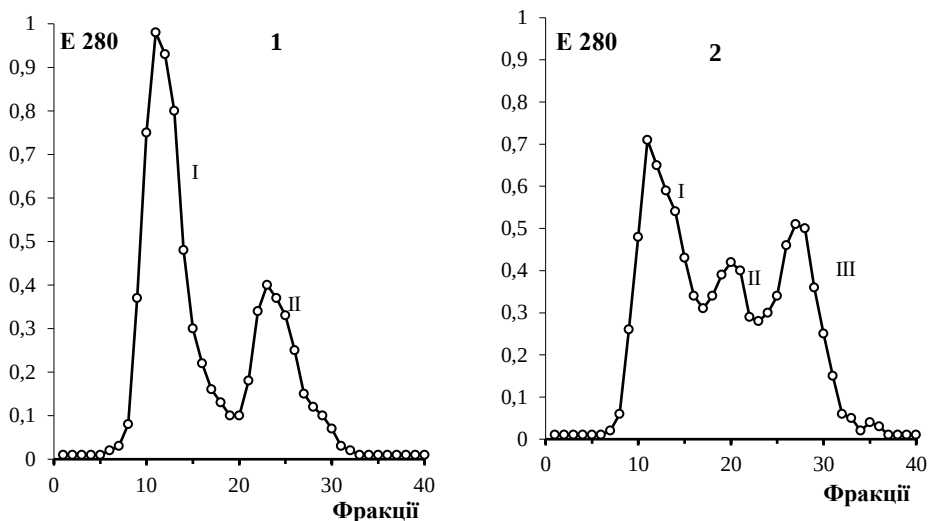


Рис. 4. Хроматограми сироватки, прогрітої при 50°С, отримані в результаті гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-25 (1) і сефадексом G-75 (2)

Більш суттєві відмінності виявлені в результаті гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-75. Вони стосуються основних білкових фракцій, які елюються з колонки у складі піків I і II (рис. 4(2)). Зміни у складі низькомолекулярних фракцій піку III (3 000 Да) незначні. Не зовсім зрозумілим на хроматограмі є великий пік I, який елюється з об'ємом, що дорівнює вільному об'єму колонки. Верхня межа виключення для цього типу сефадексу становить більше 80 000 Да. Такі молекулярні маси мають лише імуноглобуліни, деякі мінорні білки (лактоферин, лактопероксидаза) і наближається альбумін сироватки крові (Fox, 2015). Основні білки сироватки — β -лактоглобулін і α -лактальбумін, частка яких становить близько 75% від всіх білків сироватки, мають молекулярні маси 18363 Да (варіантА) і 14 178 Да відповідно. Проте відомо, що β -лактоглобулін може утворювати асоціати і перебувати розчинах у вигляді мономерів, димерів і октамерів залежно від значення рН середовища (Mercadante et al., 2012).

У нашому випадку сироватку відділяли при значенні рН 4,6. У таких умовах β -лактоглобулін утворює октамери, значення молекулярної маси яких перевищує 140 000 Да. Також необхідно відзначити, що при таких значеннях рН карбоксиль-

ні групи залишків аспарагінової кислоти α -лактальбуміну протонуються і втрачають здатність зв'язувати іони Ca^{2+} . При цьому апопротеїн α -лактальбуміну може утворювати агрегати при нагріванні до 55 °С. Очевидно, що початкові стадії агрегації можуть відбуватись певною мірою і при нагріванні до 50 °С. З огляду на це наявність великого піку I на хроматограмі (рис. 2(2) і рис. 4(2)) можна пояснити присутністю октамерів β -лактоглобуліну, а також агрегатів α -лактальбуміну у випадку прогрівання сироватки до 50 °С (рис. 4(2)). Зменшення і зміщення піку I і збільшення піку II на хроматограмі сироватки після прогрівання до 50 °С (рис. 4(2)) може бути пов'язане з розпадом октамерів β -лактоглобуліну в результаті нагрівання. Розпад димерів β -лактоглобуліну описаний під час нагрівання його розчинів при значеннях рН 6,8—7,0 (Deeth, & Bansal, 2019). Для детальнішого з'ясування впливу нагрівання сироватки до 50 °С важливо було б встановити білковий склад хроматографічних піків електрофоретичним аналізом в денатуруючих умовах у присутності додецилсульфату натрію.

Висновки

1. Короткотривале (5 хв) прогрівання до 40 °С молочної сироватки, отриманої в результаті ізоелектричного осадження казеїну при значенні рН 4,6 за даними електрофореzu і гель-фільтрації на сефадексах G-25 і G-75, не впливає на якісний і кількісний склад основних білкових фракцій. Незначне зменшення частки імунoglobulinів (з $17,5 \pm 1,2\%$ до $15,8 \pm 1,3\%$) знаходиться в межах статистичної похибки.

2. При нагріванні цієї ж сироватки протягом 5 хв при 50 °С зменшується на $6,1 \pm 0,9\%$ частка неденатурованого загального білка сироватки. За даними електрофореzu це зменшення відбувається переважно завдяки фракції імунoglobulinів, частка яких знижується з $17,5 \pm 1,2\%$ до $13,3 \pm 1,1\%$. Також за даними гель-фільтрації на сефадексі G-75 зменшується частка білкових фракцій з молекулярними масами, що перевищують 80 000 Да. Це може відбуватися завдяки розпаду октамерів β -лактоглобулінів.

Література

Юкало, В. Г., & Дацишин, К. Є. (2018). Декстранові гелі для ексклюзивної хроматографії протеїнів сироватки молока. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 20(85), 3—8.

Anema, S. G. (2017). A comparison of the kinetics of the thermal denaturation of the immunoglobulins in caprine and bovine skim milk samples. *International Dairy Journal*, 65, 1—4.

Bogahawaththa, D., & Vasiljevic, T. (2022). Advances in dairy protein science: whey proteins. In: *Understanding and Improving the Functional and Nutritional Properties of milk*. UK: Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/AS.2022.0099.06>.

Brodkorb, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Kehoe, J. J. (2016). *Heat-Induced Denaturation, Aggregation and Gelation of Whey Proteins*. NY: Springer, New York.

Calvo, M. M., Leaver, J., & Banks, J. M. (1993). Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 3(8), 719—727.

Čurlej, J., Zajác, P., Čapla, J., Golian, J., Benešová, L., Partika, A., ..., Jakabová, S. (2022). The Effect of Heat Treatment on Cow's Milk Protein Profiles. *Foods*. 11(7), 1023. <https://doi.org/10.3390/foods11071023>.

Deeth, H., & Bansal, N. (2019). Whey proteins: an overview. In: Deeth H., Bansal, N. (Eds.). *Whey Proteins: From Milk to Medicine* (1—50). London, UK: Academic Press.

Fox, P. F., Uniacke, T., Mc Sweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy chemistry and*

Biochemistry. Second Edition. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>.

Gezimati, J., Singh, H., & Creamer, L. K. (1996). Heat-induced interactions and gelation of mixtures of bovine β -lactoglobulin and serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 804—810.

Guo, M., & Wang, C. (2019). *Chemistry of whey proteins*. In: Guo M. (Ed.). *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality and Applications* (39—65). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Kelleher, C. M., Aydogdu, T., Murphy, K. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., O'Callaghan, D. J., & McCarthy, N. A. (2020). The effect of protein profile and preheating on denaturation of whey proteins and development of viscosity in milk protein beverages during heat treatment. *Int. J. Dairy Technol.*, 73, 494—501. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12679>.

Mercadante, D., Melton, L. D., Laurence, D., Norris, G. E., Loo, T. S., Williams, M. A. K., ..., Jameson G. B. (2012). Bovine β -lactoglobulin is dimeric under imitative physiological conditions: dissociation equilibrium and rate constants over the pH range of 2.5—7.5. *Biophysical Journal*, 103(2), 303—312.

Marnila, P., & Korhonen, H. (2011). *Immunoglobulins. Encyclopedia of dairy sciences: Volume 2*. Fuquay, J. W., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (Eds.). 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press. P. 807—815.

Wijayanti, H. B., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2014). Stability of whey proteins during thermal processing: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1235—1251. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105>.

Wijayanti, H. B., Brodkorb, A., Hogan, S. A., & Murphy, E. G. (2019). Thermal Denaturation, Aggregation, and Methods of Prevention. In: Deeth, H., & Bansal, N. (Eds.). *Whey Proteins: From Milk to Medicine* (185—247). London. UK: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00006-0>.

Yukalo, V., Datsyshyn, K., & Storozh, L. (2019). Electrophoretic system for express analysis of whey protein fractions. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 2/11(98), 37—44. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160186>.

Yukalo, V., Datsyshyn, K., & Storozh L. (2024). The effect of low heating temperatures on casein whey proteins. *Food science and technology*, 18(1), 51—57. <https://doi.org/10.15673/fst.v18i1.2847>.

Yukalo, V., Datsyshyn, K., Krupa, O., & Storozh, L. (2024). Adaptation of Stadler's apparatus for electrophoresis of main milk proteins. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1(11(127)), 73—80. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2024.296753>.