Бигаева Алана Владиславовна

РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ И БИОИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОКА, АССОЦИИРУЕМЫХ С НАПРАВЛЕНИЯМИ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

05.18.04 — Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель: доктор биологических наук,

профессор РАН

Вафин Рамиль Ришадович

Официальные оппоненты: Евдокимов Иван Алексеевич

доктор технических наук,

профессор ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», заведующий базовой кафедрой технологии молока и

молочных продуктов

Сермягин Александр Александрович

кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, заведующий отделом популяционной генетики и генетических основ

разведения животных

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный

университет»

Защита состоится «30» ноября 2021 г. в ____ часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН: www.vniimp.ru

Автореферат разослан «__» ____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат технических наук, старший научный сотрудник

А.Н. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Молоко и молочные продукты — неотъемлемая составляющая рациона питания человека. Любые формы дефицита молочных продуктов — источника высокоусвояемых макро- и микрокомпонентов, априори оказывают негативное влияние на здоровье населения. Поэтому исключительно важно, чтобы молочная продукция присутствовала во всех регионах страны, в том числе, где молочное животноводство не развито. Эту задачу решает производство и переработка сухого молока (СМ), мета-свойства которого формируются в процессе технологической трансформации молока-сырья.

В работах отечественных и зарубежных ученых показано, что на технологические свойства молока-сырья, рациональность его переработки и качество готовой молочной продукции существенное влияние оказывает качественный и количественный состав фракции каппа-казеина, кодируемого аллельными вариантами гена каппа-казеина (CSN3). Данные исследования характеризовали молоко либо индивидуальных животных, определенных выборок. Такая оценка информативна для селекционных действий, но не обеспечивает достоверность необходимых сведений по сборному молоку, поступающему в абсолютном большинстве случаев на предприятия. Использование на производстве СМ фактически предполагает применение наиболее сложной выборки территориальным ПО животноводческим признакам. В целом, в связи с отсутствием методологической и систематизированных результатов исследований, использование соответствующих данных по гену CSN3 в практике молокоперерабатывающих предприятий на сегодняшний день не нашло применения. Таким образом, анализ научно-технического материала позволил выдвинуть гипотезу, использование СМ, прошедшего комплексную систему оценки с расширенными критериями качества, опосредовано будет способствовать оптимизации выбора направления переработки, рационализации большинства технологических процессов и получению высококачественной продукции. В перспективе такой подход прогнозируемо ускорит направленный селекционный отбор крупного рогатого скота (КРС) в рамках решения задач по прижизненному формированию свойств животноводческого сырья, что, в свою очередь, повысит эффективность работы отечественных предприятий.

Целью работы является разработка и внедрение методологического подхода прогнозирования направлений переработки сборного молока на основе использования молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и последовательно реализованы следующие **задачи**:

- систематизировать теоретические аспекты направленного формирования свойств молока-сырья с детализацией физико-химических, функционально-технологических, паратипических и генетических факторов;

- исследовать ассоциацию полиморфизма гена *CSN3* KPC с технологическими свойствами молока-сырья, полученного от индивидуального животного;
- предложить молекулярно-генетический подход к определению в сборном молоке-сырье и в СМ соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*, ассоциированных с технологическими свойствами молока и разработать методику выполнения измерений;
- получить массив новых данных по соотношениям относительных долей аллелей гена *CSN3* в продуктовых формах молока KPC, а также создать биоинформационные алгоритмы анализа оценочных критериев границ перехода технологических свойств сухого молочного сырья и продуктов его переработки по показателям свертываемости и термоустойчивости;
- разработать технологию восстановленного стерилизованного молока с обоснованным молекулярно-генетическим методом подбором сухого молочного сырья.

Научная новизна:

- теоретически и экспериментально обосновано и осуществлено расширение оценочных критериев качества различных по влажности сырьевых форм сборного молока до молекулярно-генетических показателей;
- создана оригинальная методология определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* в сборном молоке и продуктах его переработки с низкой влажностью;
- разработана биоинформационная система оценки доминирующего аллельного варианта гена CSN3 в молоке KPC;
- определены закономерности формирования физико-химических и функционально-технологических свойств сборного молока в зависимости от соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*;
- предложена прогностическая модель переработки сырья с интегрированными молекулярно-генетическими показателями;
- доказано, что у ряда генотипов по гену CSN3 молока термоустойчивость его различных сырьевых форм предопределяется доминированием аллеля A, а способность к сычужному свертыванию B. В обоих случаях граница перехода содержание соответствующего аллеля более 75%.

Практическая значимость и реализация результатов:

- расширена область оценочных критериев функциональнотехнологических свойств различных по влажности сырьевых форм сборного молока за счет интеграции молекулярно-генетических показателей;
- разработана методика молекулярно-генетической оценки технологических свойств молока путем определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* в сборном молоке;
- разработана программа для ЭВМ и получено Свидетельство о регистрации № 2021616048 от 15.04.2021 г. «Расчет соотношения относительных долей аллелей **ж**-казеина в молоке сборном»;
- разработана и апробирована в производственных условиях технология восстановленного стерилизованного молока из СМ, учитывающая

доминирующий аллельный вариант гена *CSN3* KPC в молочном сырье. Разработан и утвержден CTO 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия».

Апробация работы. Основные результаты работы доложены, обсуждены и одобрены на XIII Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН «Перспективные исследования и новые подходы к производству и переработке сельскохозяйственного сырья и продуктов питания» (Углич, 2019), VII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых «Инновации В пищевой биотехнологии» (Кемерово, ученых Международной онлайн-конференции «Пищевые системы в цифровом мире: персонализации» научно-производственной вектор платформы «Здоровьесберегающие производство технологии: продовольствия ветпрепаратов» научно-образовательного центра мирового уровня «Инновационные решения в АПК» (Москва, 2020).

Результаты работы отмечены дипломом ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН в номинации «Лучшая научно-исследовательская работа».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 26 печатных работ, в том числе: 17 статей в журналах, рекомендованных ВАК, из них 13 в изданиях, входящих в RSCI, 3 статьи в журналах WOS, 5 статей в материалах конференций и журналах РИНЦ, получено 1 Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора, методической части, результатов собственных исследований и их анализа, а также выводов, списка использованных источников литературы и приложений. Работа изложена на 130 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы, 26 рисунков, 152 источника научно-технической информации.

Основные положения, выносимые на защиту:

- систематизированные данные ассоциативной связи ДНК-маркеров различных по влажности сырьевых форм сборного молока с направлениями его последующей переработки;
- методология определения в сборном молоке-сырье и в СМ соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* методом ПЦР-ПДРФ, ассоциированных с технологическими свойствами молока;
- результаты апробации разработанных биоинформационных алгоритмов математического моделирования оценочных критериев уровня соответствия технологических свойств сухого молочного сырья и продуктов его переработки рекомендуемым показателям по свертываемости и термоустойчивости;
- -технология восстановленного стерилизованного молока с интегрированной методологией молекулярно-генетического подбора сухого молочного сырья.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, сформулированы гипотеза, цель и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость реализации результатов исследования, представлены результаты апробации и публикации, а также данные по структуре и объему диссертационной работы.

В главе 1 представлены основные характеристики СМ, объемы его производства и переработки, состав и нормируемые свойства, принципы сушки и восстановления, факторы, оказывающие влияние на формирование качества и технологических свойств молочного сырья. Освещены аспекты производства продуктов. стерилизованных молочных В главе представлен отечественных и зарубежных научно-исследовательских работ таких ученых, как: Башаева Д.В., Вафин Р.Р., Галстян А.Г., Гильманов Х.Х., Зиновьева Н.А., Костюнина О.В., Липатов Н.Н., Петров А.Н., Радаева И.А., Свириденко Ю.Я., Тюлькин С.В., Харитонов В.Д., Храмцов А.Г., Юрова Е.А., Ярлыков Н.Г., Alexander L.S., Baldwin A., Bonfatti V., Comin A., Huppertz T., Kaminski S., Ng-Kwai-Hang K.F., Perna A. и др.

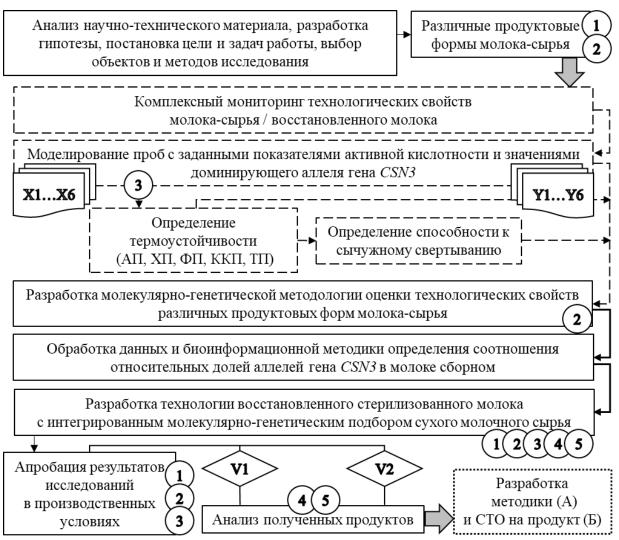
В главе 2 изложена структура, организация и схема проведения исследования (рисунок 1).

На различных этапах работы объектами исследований являлись: сырое молоко от индивидуальных животных с полиморфными генотипами гена *CSN3*, сборное сырое молоко, модельные и продуктовые формы CM сублимационной (СС) и распылительной (РС) сушки.

При выполнении работы использовали стандартизованные и общепринятые в контроле молочных продуктов методы исследований, изложенные в специализированной литературе, а также оригинальные методы, комплексно обеспечивающие выполнение поставленных задач.

Термоустойчивость (ТУ) молока в работе определяли с помощью алкогольной (АП), хлоркальциевой (ХП), фосфатной $(\Phi\Pi)$, кипятильной (ККП) и тепловой (ТП) проб. Способность к сычужному свертыванию (ССС) как одному из критериев оценки сыропригодности молока определяли посредством сычужной коагуляции молока с фиксацией ее продолжительности, характеристики сгустка, перехода общего белка в сыворотку. Оценку полиморфизма гена CSN3 выполняли путем совмещенной полимеразной цепной реакции с последующим определением полиморфизма фрагментов (ПЦР-ПДРФ) с электрофоретической длин рестрикционных детекцией результатов анализа. Статистическая обработка и визуализация экспериментальных данных проводилась с применением методов матричной алгебры с помощью программ «Mathematic», «Microsoft Excel», «Mat Cad», «Curve Expert» и др.

В главе 3 даны результаты собственных исследований. **В подглаве 3.1** осуществлен анализ влияния генотипа животного по гену *CSN3* на технологические свойства полученного от него молока. Подтверждены имеющиеся в литературе данные о распределении генотипов среди отечественных коров и об их взаимосвязи с ТУ и ССС молока (таблица 1).



Принятые сокращения и обозначения: 1 — физико-химические показатели; 2 — ПЦР-ПДРФ-анализ с электрофоретической детекцией результатов; 3 — функционально-технологические показатели; 4 — микробиологические показатели; 5 — органолептические показатели; X1...X6 — линейка значений активной кислотности от 6,0 до 7,0 с шагом 0,2; Y1...Y6 — линейка соотношений относительных долей аллелей A и B гена CSN3 и контроль; V1 и V2 — варианты технологических решений стерилизации восстановленного молока (ВМ); А — методика молекулярно-генетической оценки технологических свойств молока путем определения соотношения относительных долей аллелей гена CSN3 в молоке сборном; Б — СТО на восстановленное стерилизованное молоко из СМ

Рисунок 1 – Общая схема исследований

Таблица 1 – Распределение КРС по генотипу по гену *CSN3* и функциональнотехнологические свойства полученного от них молока

П		Распределение КРС		В том числе с генотипом по гену <i>CSN3</i>					
Показатель	Показатель		723	$AA, n = 379 \ AB, n = 223$		AA, n = 379 AB , n = 223 BB , n = 12		= 121	
		n	%	n	%	% n % n %		%	
	I	490	67,8	201	53,0	178	79,8	111	91,7
Класс молока	II	191	26,4	153	40,4	28	12,6	10	8,3
	III	42	5,8	25	6,6	17	7,6	-	-
Продолжительность образования сгу		устка, мин		29,5	5±0,4	24,6	5±0,5	16,6	5±1,0
Продолжительность термообработки коагуляции, мин		до видим	иой	64,5	5±0,5	60,7	′±0,3	32,2	£1,4

Встречаемость аллелей в рамках изученной выборки животных составила: 67.8% для аллеля A и 32.2% для аллеля B. Большинство идентифицированных животных обладало генотипом AA по гену CSN3 и давало термостабильное молоко, тогда как наилучшее с позиции продолжительности коагуляции молоко было отмечено у особей с генотипом BB. При этом наличие аллеля B гена CSN3 в геноме животных существенно влияло на улучшение коагуляционных свойств молока, а именно, на получение плотной консистенции белкового сгустка и прозрачной сыворотки.

Результаты получены на молоке индивидуальных коров. Так как на молочные предприятия поступает сборное молоко, в том числе СМ, требовались дальнейшие исследования.

пробоподготовки образцов рамках моделировали условия, имитирующие избыточные технологические воздействия них замораживание при неконтролируемой скорости. Зафиксировано значимое понижение ТУ и ССС при замораживании цельного молока. В тоже время при молока, не сепарировании изменения наблюдались. предварительном Соответственно криоконсервирование было интегрировано в технологию транспортировки и СС анализируемых материалов.

В подглаве 3.2 представлены результаты исследований влияния высушивания молока на его технологические свойства во взаимосвязи с полиморфизмом гена *CSN3*. В таблице 2 представлен усредненный физикохимический состав ВМ из СМ СС.

Таблица 2 – Усредненный физико-химический состав ВМ из СМ СС

Поуможеромую помороженя	Восстановленное молоко				
Наименование показателя	AA^1	BB^1	BB^2		
М.д. жира, %	3,65±0,15	3,77±0,18	3,66±0,17		
М.д. общего белка, %	$3,04\pm0,07$	3,21±0,09	3,11±0,08		
М.д. сывороточных белков, %	$0,83\pm0,08$	$0,80\pm0,09$	$0,76\pm0,007$		
М.д. казеиновых белков, %	2,21±0,05	$2,41\pm0,04$	2,31±0,06		
М.д. влаги, %	88,21±0,8	87,94±0,8	86,1±0,9		
М.д. СОМО, %	8,14±0,07	8,29±0,04	8,01±0,05		
М.д. лактозы, %	4,30±0,05	4,26±0,07	4,11±0,06		
Кислотность, °Т	18,0±0,5	18,5±0,5	18,5±0,5		
Концентрация Са, мг%	115,9±1,7	126,8±2,4	118,4±2,5		
pH	6,74±0,05	$6,67\pm0,05$	6,65±0,05		

Примечание: AA^1 и BB^1 - молоко CC, восстановленное до м.д. CB исходного сырья; BB^2 - образцы BB^1 с м.д. белка, приближенные к аналогичному показателю образцов группы AA^1

Молоко, полученное от коров с генотипом BB по гену CSN3, характеризовалось более высокой массовой долей жира, белка и сухих веществ в целом.

В таблице 3 представлены результаты оценки ТУ образцов ВМ из СМ СС с учётом рН исследуемых моделей-аналогов. В таблице 4 представлены результаты оценки ССС образцов AA^1 и BB^2 с применением ферментных

препаратов MICROCLERICI (химозин 2400 IMCU/г) и CHY-MAX (химозин 2500 IMCU/г).

Таблица 3 – Исследование ТУ ВМ из СМ СС

таолица з тес	ледование	1 5 DIVI H5	CIVI CC					
II			pН (±	0,05)				
Наименование	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0		
образца			Алкоголы	ная проба				
AA^1	< 68 %	< 68 %	68 %	85 %	90%	95%		
BB^1	< 68 %	< 68 %	68 %	80 %	90%	95%		
BB^2	< 68 %	< 68 %	< 68 %	68 %	72%	75%		
			Хлоркальци	невая проба				
AA^1	-	-	-	-	+	+		
BB^1	-	-	-	-	-	+		
BB^2	-	-	-	-	-	+		
		Фосфатная проба						
AA^1	-	-	-	+	+	+		
BB^1	-	-	-	+	+	+		
BB^2	-	-	-	-	-	+		
		Кислотно-кипятильная проба						
AA^1	-	-	-	0,5 мл	0,5 мл	0,8 мл		
BB^1	-	-	-	-	0,5 мл	0,5 мл		
BB^2	-	-	-	-	-	0,5 мл		
	Тепловая проба							
AA^1	15 мин.	15 мин.	35 мин.	43 мин.	90 мин.	100 мин.		
BB^1	5 мин.	12 мин.	27 мин.	33 мин.	35 мин.	60 мин.		
BB^2	15 мин.	25 мин.	30 мин.	31 мин.	35 мин.	60 мин.		

Установлено, что ТУ молока коров, несущих A-аллель гена CSN3 в диапазоне рН 6,6-7,0, была выше, чем у молока коров, несущих B-аллель.

Таблица 4 – Исследование ССС ВМ из СМ СС

таомица т теследование сее вигиз еги се							
Have town powers wavenesses	MICRO	CLERICI	CHY-MAX				
Наименование показателя	AA^1	BB^2	AA^1	BB^2			
Продолжительность сычужной коагуляции, мин	98±4	63±2	94±2	54±7			
Класс молока	III	II	III	I			
М.д. белка в сыворотке, %	1,03±0,06	$0,82\pm0,04$	$0,96\pm0,05$	$0,73\pm0,04$			
Переход общего белка в сыворотку, %, не более	35	27	33	24			

Молоко коров, несущих B-аллель гена CSN3, преобладало над молоком коров, несущих A-аллель. При этом лучшими молокосвертывающими характеристиками, независимо от генотипической принадлежности молока, обладал CHY-MAX.

В рамках разработки методики молекулярно-генетической оценки технологических свойств СМ модифицирован процесс пробоподготовки образцов – введен процесс сепарирования.

В таблице 5 представлен усредненный физико-химический состав обезжиренного сырого молока.

Таблица 5 – Состав образцов сырого обезжиренного молока перед сушкой

Наименование показателя	Образец АА0	Образец AB ⁰	Образец BB ⁰
М.д. жира, %	$0,060\pm0,006$	$0,050\pm0,004$	$0,060\pm0,005$
М.д. общего белка, %	2,82±0,11	3,05±0,13	3,38±0,15
М.д. сывороточных белков, %	$0,77\pm0,03$	$0,78\pm0,04$	$0,81\pm0,03$
М.д. казеиновых белков, %	2,04±0,10	2,18±0,09	2,60±0,11
М.д. сухих веществ, %	8,16±0,33	8,66±0,36	9,10±0,41
М.д. лактозы, %	4,60±0,31	4,67±0,30	4,80±0,35
Кислотность, °Т	17,5±0,5	17,5±0,5	18,0±0,5
Концентрация Са, мг%	121,91±3,4	139,7±3,2	136,8±4,1
pH	$6,77\pm0,05$	6,83±0,05	6,73±0,05

Примечание: AA^0 – сырое молоко животных с генотипом AA, AB^0 – AB, BB^0 – BB соответственно

Подтверждены литературные данные о повышенном содержании сухих веществ в молоке коров с генотипом BB по гену CSN3. Образцы нативного молока (AA^0, AB^0, BB^0) подвергались распылительной (AA^1, AB^1, BB^1) и сублимационной (AA^2, AB^2, BB^2) сушке. На основе сухих образцов были смоделированы системы, содержащие разные количества молока коров с исследуемыми гомозиготными генотипами.

Принцип моделирования и дальнейших действий схематично изображен на рисунке 2, а результаты исследования модельных систем даны в таблицах 6 (АП), 7 (ККП) и 8 (ТП).

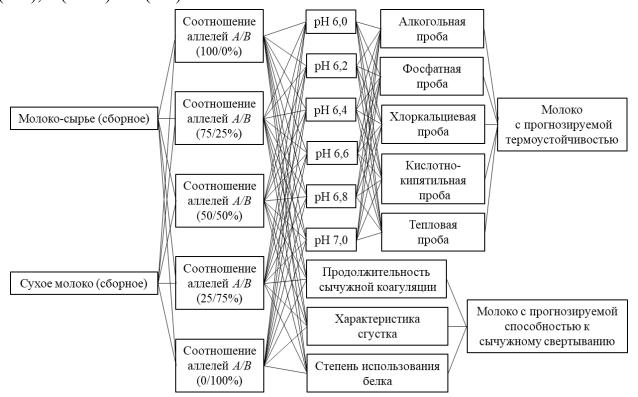


Рисунок 2 — Принципиальная схема моделирования экспериментальных образцов

Таблица 6 – Исследование ТУ ВМ методом АП

Наумамараму абразуа	рН							
Наименование образца	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0		
AA ¹ : BB ¹ (100:0%)				72 %	85%	85%		
AA ¹ : BB ¹ (75:25%)				72 %	80%	85%		
$AA^1: BB^1 (50:50\%)$				68 %	80%	85%		
$AA^1: BB^1 (25:75\%)$				68 %	75%	80%		
$AA^1: BB^1 (0:100\%)$				< 68 %	70%	75%		
AB ¹ (контроль)		< 68 %		68 %	80%	85%		
AA^2 : BB^2 (100:0%)				75 %	85%	90%		
AA^2 : BB^2 (75:25%)				72 %	85%	85%		
AA^2 : BB^2 (50:50%)				68 %	80%	85%		
AA^2 : BB^2 (25:75%)				68 %	80%	80%		
AA^2 : BB^2 (0:100%)				< 68 %	72%	80%		
AB^2 (контроль)				68 %	80%	85%		

Таблица 7 – Исследование ТУ ВМ методом ККП

Havyrayanayya afmaaya	pН				
Наименование образца	6,6	6,8	7,0		
$AA^1: BB^1 (100:0\%)$	0,5*	0,6*	0,8*		
AA ¹ : BB ¹ (75:25%)	-	0,5*	0,5*		
$AA^1: BB^1 (50:50\%)$	-	-	-		
$AA^1: BB^1 (25:75\%)$	-	-	-		
$AA^1: BB^1 (0:100\%)$	-	-	-		
AB^1 (контроль)	-	0,5*	0,5*		
AA^2 : BB^2 (100:0%)	0,5*	0,5*	0,6*		
AA ² : BB ² (75:25%)	-	-	0,5*		
AA^2 : BB^2 (50:50%)	-	-	-		
AA^2 : BB^2 (25:75%)	-	-	-		
AA^2 : BB^2 (0:100%)	-	-	-		
AB^2 (контроль)	-	0,5*	0,5*		

Примечание: «—» - отриц. результат; *кол-во 0,1н HCl, которое выдержало молоко, мл

Таблица 8 – Исследование ТУ ВМ методом ТП

таолица в песледование т з вит методом тт								
		рН						
Наименование образца	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0		
$AA^1: BB^1 (100:0\%)$		1,5 мин	33 мин	48 мин	55 мин	91 мин		
AA ¹ : BB ¹ (75:25%)		1,5 мин	32 мин	47 мин	58 мин	85 мин		
$AA^1: BB^1 (50:50\%)$		1,3 мин	31 мин	49 мин	51 мин	60 мин		
AA ¹ : BB ¹ (25:75%)		1,5 мин	30 мин	44 мин	36 мин	23 мин		
AA^1 : BB^1 (0:100%)		≤ 0,5 мин	9 мин	33 мин	25 мин	15 мин		
AB ¹ (контроль)	≤ 0,5	0,5 мин	9 мин	35 мин	45 мин	53 мин		
AA^2 : BB^2 (100:0%)	мин	1,5 мин	36 мин	53 мин	58 мин	98 мин		
AA^2 : BB^2 (75:25%)		1,1 мин	36 мин	55 мин	60 мин	95 мин		
AA^2 : BB^2 (50:50%)		1,5 мин	35 мин	52 мин	55 мин	65 мин		
AA^2 : BB^2 (25:75%)		1,5 мин	31 мин	51 мин	38 мин	21 мин		
AA^2 : BB^2 (0:100%)		0,5 мин	11 мин	28 мин	22 мин	15 мин		
AB^2 (контроль)		0,5 мин	7 мин	30 мин	39 мин	58 мин		

Примечание: ± 1 мин. при τ ≥15 мин.; ± 0 ,5 мин. при τ ≤15 мин.

Представленные в таблице 6 результаты исследований образцов ВМ из СМ СС и РС показали хорошую сходимость. Все смоделированные образцы с рН 6,4 и ниже коагулировали при добавлении 68%-го спиртового раствора. Повышение рН приводило к закономерному увеличению ТУ молока, при этом данный эффект более выражено наблюдался с увеличением в модельных системах количества молока коров с гомозиготным генотипом AA гена CSN3.

Анализ образцов по ККП (таблица 7) выявил отсутствие ТУ всех образцов при значении рН ниже 6,6. В диапазоне рН 6,6...7,0 установлены незначительные отличия между молоком всей модельной линейки по гену CSN3, подвергнутым PC и CC.

Результаты ТП (таблица 8) показали, что образцы молока РС и СС имеют схожие зависимости изменения ТУ как в градиенте рН, так и с повышением в модельных системах содержания молока коров с генотипом AA. Модели-аналоги коагулировали при рН ниже 6,2. При рН 6,4 дестабилизации подверглись образцы со 100% содержанием молока коров с генотипом BB и нативного контроля. Все остальные образцы выдерживали высокотемпературную обработку, достаточную для производства большинства видов молочной продукции, однако наиболее термоустойчивым следует считать сборное СМ с преобладанием молока, полученного от коров с генотипом AA (от 75% до 100%).

В таблице 9 представлены результаты определения ССС модельных систем молока с использованием ферментного препарата СНУ-МАХ.

Таблица 9 – Исследование ССС ВМ

Идентификатор образца	Скорость сычужной коагуляции, мин	Класс молока	Массовая доля белка в сыворотке, %	Переход общего белка в сыворотку, %, не более
AA^1 : BB^1 (100:0%)	225±4	II	$0,715\pm0,040$	25,35±0,24
AA ¹ : BB ¹ (75:25%)	203±4	II	$0,827\pm0,060$	$28,72\pm0,32$
AA^1 : BB^1 (50:50%)	185±3	II	$0,893\pm0,060$	30,58±0,41
AA ¹ : BB ¹ (25:75%)	180±3	I	$0,951\pm0,070$	31,81±0,38
AA^1 : BB^1 (0:100%)	160±3	I	$0,995\pm0,070$	32,62±0,36
AB ¹ (контроль)	110±2	II	$1,005\pm0,080$	29,73±0,27
AA^2 : BB^2 (100:0%)	205±4	I	$0,651\pm0,030$	23,09±0,22
AA^2 : BB^2 (75:25%)	180±4	I	$0,765\pm0,040$	26,56±0,31
AA^2 : BB^2 (50:50%)	270±4	I	$0,846\pm0,050$	28,97±0,33
AA^2 : BB^2 (25:75%)	180±2	I	$0,925\pm0,060$	30,94±0,42
AA^2 : BB^2 (0:100%)	165±3	I	$0,996\pm0,060$	32,66±0,34
AB ² (контроль)	210±4	I	1,003±0,080	29,67±0,04

Установлено, что независимо от способа сушки молока лучшей ССС обладали образцы сборного СМ с преобладанием сырья, полученного от коров с генотипом BB по гену CSN3 (от 75% до 100%), продолжительность коагуляции которых составила от 160 до 180 мин, тогда как максимальное время коагуляции для молока СС составило 270 мин, а для молока PC – 225 мин. Следует отметить, что в случае СС сгустки всех модельных образцов относятся к I категории, в то

время как при РС к данной категории относятся только образцы $AA^1:BB^1$ (25:75%), $AA^1:BB^1$ (0:100%). Отмечены закономерности увеличения перехода белка в сыворотку с повышением в смеси содержания молока коров с генотипом BB по гену CSN3. Вероятнее всего данный факт связан с размером мицелл казеина, формирующих сгусток.

Анализируя полученный массив данных по ТУ и ССС установлена граница качественного перехода между ними как преобладание соответствующего A или B аллеля более 75%.

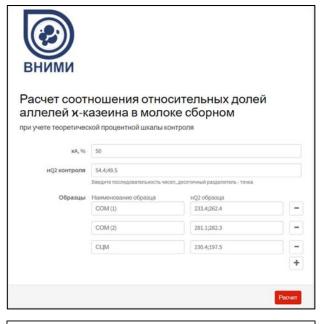
Полученные данные по ТУ и ССС молока позволили интегрировать их в молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки свойств СМ, что априори будет способствовать повышению рациональности процессов переработки.

В подглаве 3.3 представлена разработанная молекулярно-генетическая и биоинформационная система оценки технологических свойств сборного молокасырья и СМ (рисунок 3).



Рисунок 3 – Определение соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*

Разработан математический алгоритм, на базе которого было создано программное обеспечение (рисунок 4) с доступом по адресу: https://tinyurl.com/alleling.



Образец	Доля	аллеля А	Абсолютная погре	ешность От	носительная погрешно
COM (1)		82.67%	2	0.8398%	±1.01
COM (2)		84.43%		±0.028%	±0.0331
СЦМ		80.46%		±1.213%	±1.50
Шкала					
1%: 190	0.568	21%: 7.2414	41%: 2.77002	61%: 1.23069	81%: 0.451526
			42%: 2.65823		82%: 0.422545
3%: 62.		23%: 6.44432		63%: 1.13051	83%: 0.394262
		24%: 6.0956	44%: 2.44991	64%: 1.08277	84%: 0.366653
5%: 36.	5736	25%: 5.77478	45%: 2.35269	65%: 1.0365	85%: 0.339693
6%: 30.	1572	26%: 5.47864	46%: 2.2597	66%: 0.991629	86%: 0.31336
7%: 25.	574	27%: 5.20443	47%: 2.17066	67%: 0.948099	87%: 0.287633
8%: 22.	1367	28%: 4.94981	48%: 2.08534	68%: 0.905848	88%: 0.26249
9%: 19.	4632	29%: 4.71275	49%: 2.0035	69%: 0.864823	89%: 0.237912
10%: 17.	3244	30%: 4.4915	50%: 1.92493	70%: 0.824969	90%: 0.213881
11%: 15.	5744	31%: 4.28452	51%: 1.84944	71%: 0.786238	91%: 0.190377
12%: 14.	1161	32%: 4.09047	52%: 1.77686	72%: 0.748583	92%: 0.167385
13%: 12.	8822	33%: 3.90819	53%: 1.70701	73%: 0.71196	93%: 0.144887
14%: 11.	8246	34%: 3.73662	54%: 1.63975	74%: 0.676326	94%: 0.122868
15%: 10.	9079	35%: 3.57487	55%: 1.57494	75%: 0.641643	95%: 0.101312
16%: 10.	1059	36%: 3.42209	56%: 1.51244	76%: 0.607872	96%: 0.0802053
17%: 9.3	9818	37%: 3.27758	57%: 1.45214	77%: 0.574978	97%: 0.0595338
18%: 8.7	6912	38%: 3.14067	58%: 1.39391	78%: 0.542928	98%: 0.0392842
19%: 8.2	0627	39%: 3.01078	59%: 1.33766	79%: 0.51169	99%: 0.0194437
20%: 7.6	9971	40%: 2.88739	60%: 1.28329	80%: 0.481232	100%: 0.

Рисунок 4 — Интерфейс разработанной программы

Получено Свидетельство о регистрации ПО для ЭВМ № 2021616048 от 15.04.2021 г. «Расчет соотношения относительных долей аллелей казеина в молоке сборном».

В подглаве 3.4 представлены методологические принципы выборки сухого молочного сырья и предложена технология восстановленного стерилизованного молока из СМ с интегрированной разработанной системой оценки ТУ.

работе рассмотрены градации продукта по жирности: 0,5%, 2,5%, 3,2%. В рамках оценки качества СМ контролировали нормируемые показатели и тепловой Дополнительно нологические свойства СМ оценивали применением разработанного определения соотношения относительных долей аллелей гена CSN3. Пороговым значением соответствии c результатами, полученными в подглаве 3.2, являлось 75%-ное содержание аллеля A.

В переработку допускалось сырье с титруемой кислотностью от 16 до 21 °T, индексом растворимости не более 0,2 см³ сырого осадка, группой чистоты не ниже I, среднетемпературного и выше

среднего тепловых классов и ТУ не ниже IV группы по алкогольной пробе. Молоко I и II групп ТУ отправляли на стерилизацию без добавления солейстабилизаторов. Принципиальная технологическая схема производства продукта на лабораторном этапе представлена на рисунке 5.

Восстановление СМ проводили в соответствии с произведенными расчетами и с использованием дистиллированной воды с рН $(6,5\pm0,1)$ при перемешивании при 500 мин⁻¹ и температуре $(40\pm2)^{\circ}$ С с выдержкой в течение 15 мин, после чего восстановленный продукт диспергировали на лабораторном

плунжерном гомогенизаторе Manton Gaulin модель 15М8ТА при давлении (15 ± 1) МПа и температуре (40-50)°С.



Рисунок 5 — Схема лабораторного получения стерилизованного молока

Если ТУ нормализованной смеси оказывалась ниже ожидаемой, как дополнительный фактор стабилизации системы использовали солистабилизаторы: $Na_3C_6H_5O_7\cdot 5,5H_2O$ (E331iii); $K_3C_6H_5O_7\cdot H_2O$ (E332ii); $K_2HPO_4\cdot 3H_2O$ (E340iii); $Na_2HPO_4\cdot 12H_2O$ (E339ii). В работе дополнительно использовали соль «Фонакон» — смесь триполифосфатов натрия, кислого пирофосфата натрия с примесью орто- и других конденсированных фосфатов.

ТУ молока IV и III групп повышали до I или II группы путем добавления одной из вышеуказанных солей-стабилизаторов в оптимальной дозе 0,01–0,03 % от массы молока. Раствор соли вносили в нормализованное молоко непосредственно перед тепловой обработкой.

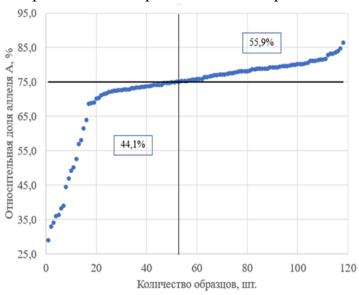


Рисунок 6 — Распределение содержания относительных долей аллеля A (%) в образцах СМ

По результатам исследований термоустойчивые образцы СМ резервировали для разработки параметров процесса стерилизации и оценки качества продукции, в том числе в хранении.

В рамках работы рассмотрены 118 образцов СМ различных производителей, выработанного в период весналето 2020 года.

На рисунке 6 представлены данные распределения исследованных образцов молока по доминирующему в

соотношении относительных долей аллелей гена CSN3 варианту. Было выявлено 55,9% (66 шт.) образцов с относительной долей аллеля A 75% и выше.

Следующим этапом работы проведены исследования по определению ТУ

указанных образцов по АП и ТП (рисунок 7).

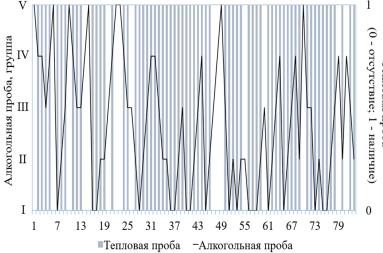


Рисунок 7 — Распределение образцов СМ по результатам АП и ТП

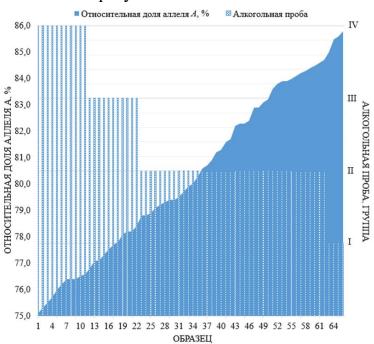


Рисунок 8 — Результаты АП с учетом относительной доли аллеля A, %

Образцы, не выдержавшие одну или обе из проб, были заявленных исключены из дальнейших исследований. Анализ лученных данных показывал отсутствие корреляционных зависимостей между АП и ТП. При этом, полученным согласно данным ПО АΠ, образцах исследованных наблюдалось распределение по группам (рисунок 8).

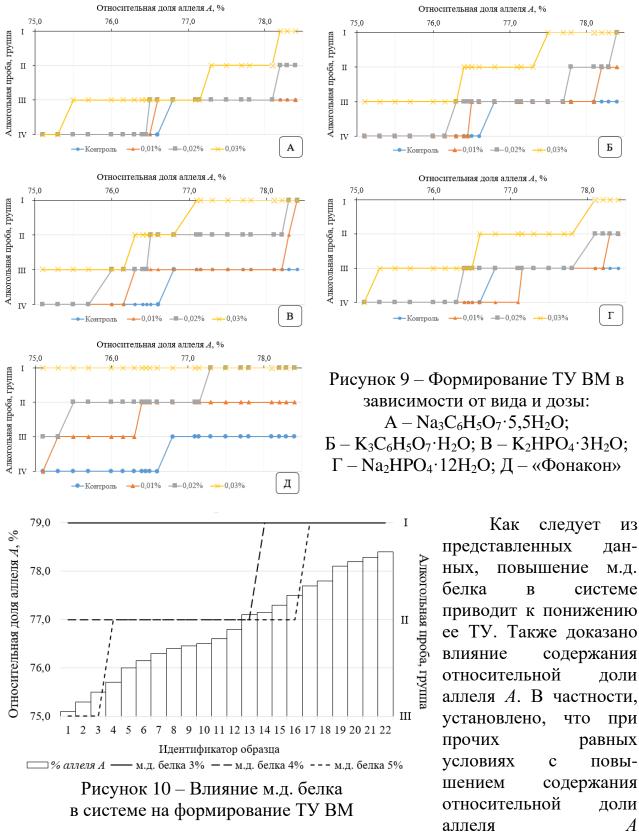
Из них 22 образца IV и IIIгруппы ТУ были подвергнуты корректировке (рисунок 9, А-Д). Наибольшая эффективность достигалась внесения OT полифосфатной соли «Фонакон» (рисунок Д).

В целом ПО результатам этапа исследований установлена градация солей эффективности их влияния минимальной допустимой дозировке – 0,01%: «Фонакон» > $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ > $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5,5H_2O$ K3C6H5O7·H2O > $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.

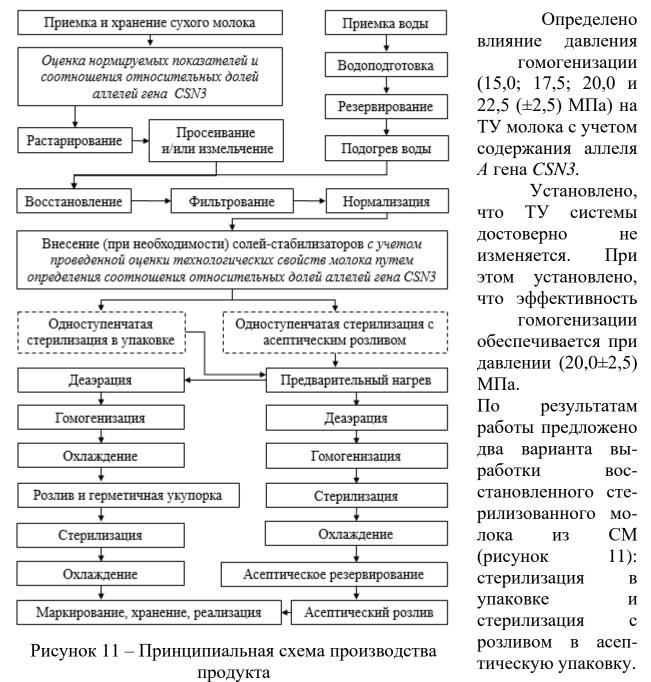
Результаты исследований достоверно демонстрируют зависимость количества внесенной соли-стабилизатора от содержания относительной доли аллеля A гена CSN3. Установлено, что с повышением его содержания ТУ молока увеличивается.

Проведен ряд исследований на моделях аналогах с выровненной концентрацией белка до 3,0%, а также пошаговым (4,0% и 5,0%) ее дальнейшим повышением. Снижение концентрации белка осуществляли добавлением сухой лактозы и воды, а концентрирование — увеличением навески СМ. В качестве

соли-стабилизатора использовали «Фонакон» с дозировкой 0,03%. Результаты представлены на рисунке 10.



ориентировочно более 76,0% ТУ молока повышается до II или I групп, что подтверждает целесообразность расширения области оценочных критериев качества СМ.



Предложенные производственные схемы не предполагают существенных изменений в технологии стерилизованного молока.

Независимо от технологии производства стерилизованное молоко должно соответствовать требованиям СТО 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия».

По микробиологическим показателям продукт должен отвечать требованиям промышленной стерильности по TP TC 033/2013. Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в продукте не должны превышать норм, установленных регламентами TP TC 021/2011 и TP TC 033/2013.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- 1. Разработана технология восстановленного стерилизованного молока из СМ с интегрированной в область оценочных критериев сухого сырья молекулярно-генетической и биоинформационной системой оценки доминирующего аллельного варианта гена *CSN3*. Разработан и утвержден СТО 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия».
- 2. Доказано, что интегральные функционально-технологические свойства сборного молока ТУ и ССС, обусловлены не только биофизическими, биохимическими, паратипическими, но и генетическими факторами, которые определяют породные, линейные и генотипические различия по данным свойствам.
- 3. Установлено, что по частоте встречаемости в отношении гена CSN3, которая ощутимо варьируется в зависимости от породы животных и их ареала разведения, наиболее распространенными являются аллельные варианты A и B со значительным превалированием аллеля A над B.
- 4. Показана отчетливая тенденция положительного влияния генотипа BB по гену CSN3 коров на ССС молока, а генотипа AA на ТУ молока.
- 5. Установлена сходимость результатов идентификации образцов сырого молока и СМ по A- и B-аллельным вариантам гена CSN3 по методике ПЦР-ПДРФ-анализа.
- 6. Разработан методологический подход и подготовлена методика по определению соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* в сборном молоке-сырье и в сборном CM.
- 7. Экспериментально установлено, что СМП, полученные из сборного молока с содержанием генотипа *AA* по гену *CSN3* более 75% обладают наибольшей ТУ, а менее 25% лучшей ССС при прочих равных концентрационных характеристиках системы и параметрах внешнего воздействия. Молоко с соотношением относительных долей аллелей в диапазоне (25-75)% не обладает выраженными технологическими преимуществами.

Список трудов, опубликованных по материалам диссертации

Статьи в журналах, индексируемых в WoS/Scopus

- 1. Tyulkin, S.V. DNA markers a prediction criterion for yield and quality of raw milk / S.V. Tyulkin, R.R. Vafin, Kh.Kh. Gilmanov, [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences. -2019.-Vol. 6, N438.-P. 177-183. DOI: 10.32014/2019.2518-170X.168
- 2. Kruchinin, A.G. Regarding the biopolymers heat stability formation / A.G. Kruchinin, R.R. Vafin, I.A. Radaeva, [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences. − 2020. − Vol. 4, № 442. − P. 77–85. DOI: 10.32014/2020.2518-170X.87
- 3. Kruchinin, A.G. Baromembrane technologies as a prospective alternative to vacuum evaporation in the dry milk production / A.G. Kruchinin, E.E. Illarionova, A.V. Bigaeva, [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series Chemistry and Technology. − 2021. − Vol. 1, № 445. − P. 133–138. DOI: 10.32014/2021.2518-1491.17

Статьи в журналах, рецензируемых ВАК

- 4. Бигаева, А.В. Термоустойчивость молока коров с разными генотипами каппа-казеина / А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов, С.В. Тюлькин, [и др.] // Пищевая промышленность. -2019. -№ 10. C. 59–61. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10159
- 5. Бигаева, А.В. Сыропригодность молока коров с разными генотипами каппа-казеина / А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов, С.В. Тюлькин, [и др.] // Сыроделие и маслоделие. $-2019. \text{N}_{\text{2}} 6. \text{C}. 26-27.$
- 6. Кручинин, А.Г. К вопросу зависимости технологических свойств молока от его генотипической принадлежности по каппа-казеину/А.Г. Кручинин, Р.Р. Вафин, И.А. Радаева, [и др.] // Сыроделие и маслоделие. − 2020. − № 2. − С. 52–54. DOI: 10.31515/2073-4018-2020-2-50-52
- 7. Бигаева, А.В. Влияние полиморфных вариантов гена *CSN3* на технологические свойства молока / А.В. Бигаева, А.Г. Кручинин, И.А. Радаева, [и др.] // Молочная Промышленность. -2020. -№ 4. C. 54–55. DOI: 10.31515/1019-8946-2020-04-54-55
- 8. Радаева, И.А. Формирование технологических свойств сухого молока / И.А. Радаева, А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, [и др.] // Вестник МГТУ. 2020. Т. 23, № 3. С. 280–290. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-280-290
- 9. Радаева, И.А. Современные ДНК-методы в оценке технологического потенциала молочного сырья / И.А. Радаева, Р.Р. Вафин, С.Н. Туровская, [и др.] // Пищевая промышленность. -2020. -№ 5. С. 19-22. DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10049
- 10. Кручинин, А.Г. Электрофоретические методы изучения белковых систем / А.Г. Кручинин, А.В. Бигаева, Е.Г. Лазарева, [и др.] //Молочная промышленность. -2020. № 6. С. 16–18. DOI: 10.31515/1019-8946-2020-06-16-18
- 11. Кручинин, А.Г. Роль технологических свойств сухого молока в формировании качества пищевых систем / А.Г. Кручинин, Е.Е. Илларионова,

- А.В. Бигаева, [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2020. № 8. С. 166—173. DOI: 10.36718/1819-4036-2020-8-166-173
- 12. Кручинин, А.Г. К вопросу влияния замораживания на технологические свойства молока / А.Г. Кручинин, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Вестник Международной академии холода. -2020. -№ 3. С. 58–63. DOI: 10.17586/1606-4313-2020-19-3-58-63
- 13. Кручинин, А.Г. Молекулярно-генетические модификации κ -казеина / А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. − 2020. − № 4 (376). − С. 12-16. DOI: 10.26297/0579-3009.2020.4.3
- 14. Гильманов, Х.Х. Разработка способа определения в сухом молоке и сборном молоке-сырье соотношения относительных долей аллелей гена каппаказеина крупного рогатого скота / Х.Х. Гильманов, В.К. Семипятный, А.В. Бигаева, [и др.] // Техника и технология пищевых производств. − 2020. − Т. 50, № 3. − С. 525–535. DOI: 10.21603/2074-9414-2020-3-525-535
- 15. Вафин, Р.Р. Полиморфизм гена к-казеина как фактор формирования технологических свойств сухого молока / Р.Р. Вафин, И.А. Радаева, А.Г. Кручинин, [и др.] // Food and raw materials. 2021. № 1. С. 95—105. DOI: 10.21603/2308-4057-2021-1-95-105
- 16. Михайлова, И.Ю. Влияние генетических факторов на продуктивность коров и качество молока / И.Ю. Михайлова, Е.Г. Лазарева, А.В. Бигаева, [и др.] // Пищевая промышленность. -2021. № 1. C. 36–40. DOI: 10.24411/0235-2486-2021-10007
- 17. Илларионова, Е.Е. Ассоциация полиморфизмов в биокластере генов казеина и сывороточных белков с технологическими свойствами молочного сырья / Е.Е. Илларионова, А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, А.В. Бигаева // Молочная промышленность. -2021. № 3. C. 60–62. DOI: 10.31515/1019-8946-2021-03-60-62
- 18. Кручинин, А.Г. Влияние способов концентрирования на технологические свойства сухого молока / А.Г. Кручинин, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева, [и др.] // Вестник КрасГАУ. -2021.-№ 2.- C. 135–142. DOI: 10.36718/1819-4036-2021-2-135-142
- 19. Кручинин, А.Г. Оценка влияния полиморфизма гена к-казеина в сухом молоке на технологические свойства кислотно-индуцированных молочных гелей / А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева // Техника и технология пищевых производств. 2021. Т. 51, № 1. С. 53—56. DOI: 10.21603/2074-9414-2021-1-53-66
- 20. Туровская, С.Н. Исследование свойств замороженного молока / С.Н. Туровская, А.В. Бигаева, Т.О. Робкова, [и др.] // Молочная промышленность. 2021. № 2. С. 32—34. DOI: 10.31515/1019-8946-2021-02-32-34

Статьи в материалах конференций и журналах, индексируемых в РИНЦ

21. Бигаева, А.В. Современные направления улучшения качества и безопасности молочного сырья / А.В. Бигаева // В сборнике: Материалы VII

Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Инновации в пищевой биотехнологии». – 2019. – С. 321–323.

- 22. Бигаева, А.В. Сравнительный анализ технологических свойств молока коров с разными генотипами и-казеина / А.В. Бигаева, Р.Р. Вафин, А.Г. Галстян // В сборнике: Материалы XIII Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ОСХН РАН «Перспективные исследования и новые подходы к производству и переработки сельскохозяйственного сырья и продуктов питания». 2019. С. 52–57.
- 23. Бигаева, А.В. Современное обеспечение водоподготовки в технологии восстановленного молока / А.В. Бигаева, С.Н. Туровская // Переработка молока. 2020. №1 (243). С. 22–25.
- 24. Радаева, И.А. Комплексный мониторинг технологических свойств сухого молока как основа для биоинформационного моделирования / И.А. Радаева, А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, [и др.] // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством: сборник научных трудов. 2020. Т. 1. С.443—450. DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-443-450
- 25. Кручинин, А.Г. Влияние фракционного состава казеина на технологические свойства сырого молока / А.Г. Кручинин, А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством: сборник научных трудов. 2020. Т. 1. С.292—297. DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-292-297

Программа для электронных вычислительных машин (ЭВМ)

26. Программа для расчета соотношения относительных долей аллелей к-казеина в молоке сборном / Бигаева А.В., Семипятный В.К., Гильманов Х.Х., [и др.] Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021616048 от 15.04.2021 г.

Список сокращений и условных обозначений

 $A\Pi$ — алкогольная проба;

ВМ – восстановленное молоко;

ККП – кислотно-кипятильная проба;

КРС – крупный рогатый скот;

РС – распылительная сушка;

СМ – сухое молоко;

СС – сублимационная сушка;

ССС – способность к сычужному свертыванию;

ТП – тепловая проба;

ТУ – термоустойчивость;

ФП – фосфатная проба;

ХП – хлоркальциевая проба;

CSN3 — ген \varkappa -казеина (каппа-казеина).