ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи

БИГАЕВА АЛАНА ВЛАДИСЛАВОВНА

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

Специальность: 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор РАН
Вафин Р.Р.

Москва, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10
1.1 Сухое молоко – стратегический продукт 10
1.1.1 Объемы производства и переработки сухого молока 10
1.1.2 Основные компоненты и нормируемые свойства сухого молока 11
1.1.3 Сухие молочные продукты – принципы производства и переработки 16
1.2 Факторы формирования качества и функционально-технологических свойств молочного сырья 19
1.3 Стерилизованные молочные продукты 29
ГЛАВА 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ 33
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 33
2.1.1 Физико-химический анализ образцов 35
2.1.2 Восстановление сухого молока 35
2.1.3 Пробоподготовка образцов для оценки термоустойчивости 36
2.1.4 Определение термоустойчивости по алкогольной, хлоркальциевой, фосфатной, кислотно-кипятильной и тепловой пробам 36
2.1.5 Определение способности к сычужному свертыванию 38
2.1.6 ПЦР-ПДРФ идентификация аллельных вариантов гена *CSN3* 40
2.1.7 Математическая обработка экспериментальных данных 41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 45
3.1 Исследование ассоциации полиморфизма гена *CSN3* крупного рогатого скота с технологическими свойствами сырого молока 45
3.2 Исследование ассоциации полиморфизма гена *CSN3* крупного рогатого скота с технологическими свойствами сухого молока 51
3.3 Молекулярно-генетическая и биоинформационная система оценки технологических свойств в сборном молоке-сырье и сухом молоке 62
3.4 Разработка технологии восстановленного стерилизованного молока с интегрированной методикой идентификации соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* для оценки технологических свойств 78

3.4.1 Методологические принципы выборки сухого молока 82
3.4.2 Частная технология восстановленного стерилизованного молока с обоснованным молекулярно-генетическим методом подбором сухого молочного сырья 88
ВЫВОДЫ 95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 98
Приложение 1 116
Приложение 2 117
Приложение 3 118
Приложение 4 126
Приложение 5 127

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Молоко и молочные продукты - неотъемлемая составляющая рациона питания человека в виду высокой биологической и пищевой ценности. В 2020 году среднегодовое потребление молока и молочной продукции в России составило до 240 кг/чел. в год, что существенно меньше рекомендуемой Министерством здравоохранения РФ нормы в 325 кг/чел. в год [66, 82]. Дефицит молочных продуктов, источников ценных сбалансированных по аминокислотному составу белков, оказывает негативное влияние на здоровье человека. Поэтому исключительно важно, чтобы молочная продукция присутствовала во всех регионах страны, в том числе в тех труднодоступных областях, где молочное животноводство не развито. Эту задачу помогает решать производство продукта длительного хранения – сухого молока (СМ).

СМ для производства высокоценных пищевых продуктов должно обладать определенными физико-химическими и технологическими свойствами [71, 73, 122, 123, 142]. Одним из наиболее важных технологических и потребительских показателей СМ является нормируемое содержание массовой доли белка [46, 142]. На сегодняшний день известно, что основная часть белков молока представлена различными фракциями казеинов. В работах отечественных и зарубежных ученых показано, что на технологические свойства молока, рациональность его переработки и качество готовой молочной продукции существенное влияние оказывает количество фракции $\varkappa$-казеина и преобладающая аллель гена $\varkappa$-казеина (*CSN3)*, кодирующего данный белок [25, 26, 28, 43, 49, 55, 86, 93, 102, 108, 109, 114, 117, 119, 143, 145]. При этом проведенные исследования характеризовали молоко либо отдельных животных, либо их определенных выборок в рамках тех или иных хозяйств. Такая оценка информативна для селекционных действий, но не позволяет получать достоверное описание качественного и количественного состава белков для сборного молока, поступающего в абсолютном большинстве случаев на предприятия. Использование в производстве СМ фактически предполагает

применение наиболее сложной выборки по территориальным и животноводческим признакам. В целом, в связи с отсутствием методологической базы и систематизированных результатов исследований, использование соответствующих данных по гену *CSN3* в практике молокоперерабатывающих предприятий на сегодняшний день не нашло применения. При этом уровень развития современных методов ДНК-технологий позволяет осуществлять селекционный отбор пород с высокой молочной продуктивностью и с улучшенными показателями получаемого сырья, что делает реальным прогнозирование качества и эффективности переработки различных продуктовых форм молока-сырья. Таким образом, использование СМ, прошедшего комплексную систему оценки с расширенными критериями качества, опосредовано поспособствует оптимизации выбора направления переработки, рационализации большинства технологических процессов и получению высококачественной продукции. В дальнейшей перспективе такой систематизированный подход прогнозируемо ускорит направленный селекционный отбор крупного рогатого скота (КРС) в рамках решения задач по прижизненному формированию свойств животноводческого сырья, что, в свою очередь, априори предполагает повышение эффективности работы отечественных предприятий.

Степень разработанности темы. Изучением полиморфизма генов молочных белков коров различных пород, разработкой и совершенствованием технологий производства и переработки концентрированных форм молока-сырья, созданием методологических баз контроля качества и безопасности, а также оптимизацией производственных схем занимались многие ученые, в том числе 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.J., Baldwin A., Bonfatti V., Comin A., Huppertz T., Kaminski S., Ng-Kwai-Hang K.F., Perna A. и др.

Систематизированный анализ опубликованных материалов позволил выдвинуть гипотезу о наличии существенного потенциала в интеграции данных по

полиморфизму генов молочных белков в качестве современных критериев выбора направления переработки различных продуктовых форм молочного сырья.

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* КРС 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 КРС, 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 КРС;

- 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 функционально-технологических 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 (Приложение 1);

- разработана программа для ЭВМ и получено Свидетельство о регистрации № 2021616048 от 15.04.2021 г. «Расчет соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном» (Приложение 2);

- разработана и апробирована в производственных условиях технология восстановленного стерилизованного молока из СМ, учитывающая доминирующий аллельный вариант гена *CSN3* КРС в молочном сырье. Разработан и утвержден СТО 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия» (Приложение 3).

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследований не менее чем в 3-х кратной повторности, с применением современных методов анализа и оборудования, а также методов статистической обработки данных.

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 ученых «Инновации в пищевой биотехнологии» (Кемерово, 2019), Международной онлайн-конференции «Пищевые системы в цифровом мире: вектор персонализации» научно-производственной платформы «Здоровьесберегающие технологии: производство продовольствия и 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» (Приложение 4).

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 (Приложение 5).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Сухое молоко – стратегический продукт

СМ – обезвоженный продукт, получаемый на основе ксероанабиоза, принципа консервирования, при котором в результате тепловой сушки из молока удаляется влага и происходит плазмолиз микробиальных клеток [22, 52]. СМ является и готовым продуктом, реализуемым в потребительской таре, и универсальным сырьем во множестве пищевых производств, как в сухом, так и в восстановленном до требуемой концентрации сухих веществ состоянии. Данный продукт гарантирует круглогодичное обеспечение сырьевой базы молокоперерабатывающих производств, что положительно влияет на постоянство выпуска и стабильность качества выпускаемой пищевой продукции на территории всей страны, независимо от логистических факторов [91, 147].

1.1.1 Объемы производства и переработки сухого молока

На мировых рынках СМ является биржевым товаром, активно экспортируемым и импортируемым всеми странами в зависимости от региона их расположения и культуры потребления. Так основными производителями СМ являются Новая Зеландия, Китай, страны Европейского союза, США, Индия, Австралия и Бразилия [50].

Продукт производят из молока-сырья путем его сгущения и сушки [69], что предполагает прямую взаимосвязь с наличием развитой животноводческой базы, обеспечивающей достаточные объемы производства сырого молока. В России за последние 10 лет суммарное производство сырого молока увеличилось на 3,2% и составило 32,2 млн т в 2020 году [67].

При этом по данным Росстата в 2017-2019 гг. годовые объемы производства сухого цельного (СЦМ) и обезжиренного (СОМ) молока в РФ составляли в среднем 62 и 80 тыс. т соответственно [76], что подтверждается данными Аналитического центра MilkNews, согласно которым в 2019 году в России было произведено 63 тыс. т СЦМ и 87 тыс. т СОМ. Причем за последнее пятилетие наблюдается

положительная тенденция по увеличению выпуска СМ. Сегодня в России производители СМ сосредоточены в Приволжском; Центральном; Сибирском и Северо-Западном федеральных округах.

Однако, необходимо учитывать, что фактическое количество переработки СМ в России практически в два раза превышает указанные объемы и составляет 280-305 тыс. т. Недостающие объемы СМ импортируются из таких стран, как Республика Беларусь, Уругвай, Новая Зеландия [50].

В рамках борьбы с зависимостью от зарубежных поставок при отмечающемся дефиците сухой молочной продукции, актуальны и необходимы как мероприятия по развитию сырьевой базы, так и современные технологические решения по увеличению эффективности переработки уже имеющихся объемов [63, 92]. Это предполагает систематизированные исследования качественных характеристик сухих молочных продуктов (СМП).

1.1.2 Основные компоненты и нормируемые свойства сухого молока

В виду того, что СМ получают при высушивании пастеризованного молока, удаляя из него лишь воду (85,5-89,5%), то основными компонентами СМ являются сухие вещества свежего молока, а именно, белки (2,9-5,0%), жиры (2,5-6,0%), углеводы (3,6-5,5% лактозы) и минеральные вещества (0,6-0,9%) [59, 83, 87, 89].

Различают три основные группы белков молока: казеины (~80% от общего количества белков), сывороточные и минорные белки (~19%), белки оболочек жировых шариков (~1%) [59, 83].

Казеины считаются наиболее важными белками молока и содержатся в нем в основном в виде казеинаткальцийфосфатного комплекса (ККФК). ККФК образует мицеллы, состоящие из казеината кальция, соединенного с коллоидным фосфатом кальция. Мицеллы казеина – это почти сферические, рыхлые, пористые, сильно гидратированные частицы диаметром от 50 до 600 нм со средним диаметром около 150 нм [83, 88]. Их внутреннее устройство до сих пор не расшифровано, вместе с тем выделяют три основные модели их строения: нанокластерную,

субмицеллярную и модель двойного связывания [83]. Небольшая часть казеинов содержится в молоке в виде мономеров, полимеров и субмицелл.

При этом казеины подразделяются на 4 фракции: $\alpha s1$- (~40%), $\alpha s2$- (~10%), β- (~39%) и $\varkappa$-казеины (~11%) [27]. Все они относятся к фосфопротеинам, то есть содержат остатки фосфорной кислоты (серинфосфаты): $\alpha s1$-казеин – 11 остатков, $\alpha s2$-казеин – восемь, β-казеин – пять и $\varkappa$-казеин – один. Вследствие этого αs- и β-казеины, чувствительные к ионам кальция, в их присутствии агрегируют с образованием кальциевых мостиков и выпадают в осадок. Тогда как $\varkappa$-казеин, содержащий углеводную часть с сильными гидрофильными свойствами и высоким отрицательным зарядом, не осаждается ионами кальция и выполняет защитную роль по отношению к казеиновым мицеллам.

К сывороточным относят белки, не осаждающиеся из молока кислотой при pH 4,6-4,7. Сывороточные белки составляют до 20% белков молока. Они имеют глобулярную форму. В отличие от казеинов они содержат большее количество незаменимых аминокислот (цистеина, лизина и триптофана), поэтому обладают большей биологической ценностью [27].

Среди сывороточных белков различают β-лактоглобулин, α-лактальбумин, иммуноглобулины, альбумин сыворотки крови, лактоферрин и другие минорные белки.

β-лактоглобулин составляет 50-54% белков сыворотки. При пастеризации молока он выпадает в осадок вместе с $Ca_3(PO_4)_2$ в составе молочного камня и образует комплексы с $\varkappa$-казеином казеиновых мицелл. Образование комплексов β-лактоглобулин - $\varkappa$-казеин регрессирует атаку $\varkappa$-казеина сычужным ферментом и влияет на термоустойчивость казеиновых мицелл [27, 83, 88].

α-лактальбумин составляет 20-25% сывороточных белков. Он является самой термостабильной частью сывороточных белков, благодаря способности к ренатурации [98]. β-лактоглобулин и α-лактальбумин не свертываются под воздействием сычужного фермента и не коагулируют в изоэлектрической точке из-за своей большой гидратированности.

Иммуноглобулины представляют собой группу высокомолекулярных белков, обладающих свойствами антител. Иммуноглобулины составляют до 10% сывороточных белков молока и до 90% сывороточных белков молозива. Альбумин сыворотки крови содержится в молоке в незначительных количествах, повышение его содержания является индикацией заболевания животного маститом. Лактоферрин считается белком с бактерицидными свойствами, он, как и иммуноглобулины, содержится в большем количестве в молозиве.

Сыворотка содержит также такие минорные фрагменты, как протеозно-пептонная фракция, представляющая собой фрагменты β-казеина [27].

К третьей группе белков относятся гликопротеины, структурные элементы жировых шариков. Они расположены или во внутреннем липидном слое оболочки жировых шариков, или пронизывают её, или располагаются на внешней поверхности оболочки. Эти белки составляют около 1% от общего количества белков [27, 83].

Все белковые фракции молока, в зависимости от генотипа лактирующего животного, существуют в нескольких генетических вариантах, различающихся по своей первичной структуре [48].

Молочный жир определяет питательность и энергетическую ценность молока. Он характеризуется сложным составом, главным компонентом которого являются смеси триацилглицеринов. Кроме них в молоке обнаруживаются ди- и моноацилглицерины, фосфатиды (кефалин, лецитин, сфингомиелин), стерины, свободные жирные кислоты, жирорастворимые витамины [27, 83, 104]. Молочный жир является наиболее непостоянным компонентом молока.

Он представлен мельчайшими жировыми шариками, размеры которых колеблются в диапазоне от 0,1 до 20 мкм [83]. В виду своей легкости в течении времени они всплывают на поверхность молока, образуя слой сливок. Крупные шарики, формируемые под влиянием белка агглютинина, отстаиваются быстрее мелких. Однако влияние агглютинина нивелируется тепловой (2 минуты, 75 °С) либо механической обработкой [83].

Основным углеводом молока является лактоза. Доля лактозы среди углеводов молока составляет 99,7%, также в молоке обнаруживаются моносахариды (глюкоза, галактоза и их производные) и некоторые олигосахариды. Лактоза и часть моносахаридов находятся в сыворотке свободно в виде истинного раствора, тогда как часть моносахаридов и их производных входит в состав углеводных компонентов гликопротеинов [27].

В золе молока содержится 0,7-0,8% минеральных веществ, представленных такими элементами, как: Ca, Mg, P, Na, K, CI, S, Fe, Cu, Co, I, F, Mn, Zn и др. [27, 83]. Важнейшими макроэлементами молока являются кальций и фосфор. Белки молока - лучший источник усвояемого кальция для организма. Кальций является составной частью казеиновых мицелл, от его содержания зависят их размер и устойчивость. Также в молоке он представлен в виде солей - фосфатов и цитратов. В основном эти соли содержатся в коллоидном состоянии, в виде агрегатов молекул; небольшая их часть представлена в виде истинного раствора. Фосфор в молоке по большей части содержится в неорганической форме, а в органической форме он представлен в связи с казеином и оболочками жировых шариков.

Соли кальция и фосфора имеют огромное значение для процессов переработки молока. К примеру, недостаточное количество солей кальция ухудшает сычужное свертывание молока [30, 32], избыток солей кальция приводит к свертыванию молока при стерилизации [47]; присутствие фосфора в оболочке жировых шариков стабилизирует их, а неорганический фосфор способствует развитию молочнокислых бактерий [27].

Соли калия и натрия создают нормальное осмотическое давление, обусловливают буферную емкость, обеспечивают солевое равновесие, регулируют количество ионизированного кальция, влияющего на размеры и стабильность казеиновых мицелл. Они содержатся в ионно-молекулярном состоянии в виде хорошо диссоциирующих цитратов, хлоридов и фосфатов.

К микроэлементам молока относят медь, железо, цинк, кобальт, марганец, йод, фтор, селен, свинец и др. Эти вещества жизненно необходимы, они оказывают

влияние на пищевую ценность и качество молока и молочных продуктов, но их содержание не превышает 0,1% общего количества минеральных веществ.

Все компонентные составляющие системы оказывают влияние на многочисленные свойства как нативной формы молока, так и ангидрированного продукта. В виду чего производство СМ нормируется требованиями действующих технических регламентов ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» и дополняющим их стандартом ГОСТ 33629-2015 «Консервы молочные. Молоко сухое. Технические условия», требования которого представлены в таблице 1 [69, 91, 92].

Таблица 1 – Требования стандарта по производству СМ

Органолептические показатели сухого молока			
Наименование показателя	Характеристика молока		
Внешний вид и консистенция	Однородный мелкий сухой порошок		
Цвет	Белый или белый со светло-кремовым оттенком, равномерный по всей массе		
Вкус и запах	Чистый, свойственный пастеризованному молоку		
Физико-химические показатели сухого молока			
Наименование показателя	Норма для молока		
	обезжиренного	частично обезжиренного	цельного
Массовая доля влаги, %, не более	5,0	4,0	
Массовая доля жира, %	Не более 1,5	От 1,5 до 26,0	От 26,0 до 41,9
Массовая доля белка в сухом обезжиренном молочном остатке, %, не менее	34,0		
Массовая доля молочного сахара (лактозы), %	От 54,0 до 47,0 включ.	От 52,0 до 39,0 включ.	От 40,0 до 31,5 включ.
Индекс растворимости, $см^3$ сырого осадка, не более	0,2		
Группа чистоты, не ниже	I		
Кислотность, °Т (% молочной кислоты)	От 14 до 21 включ. (от 0,126 до 0,189 включ.)		

Соблюдение указанных выше норм и требований касательно физико-химических и санитарно-микробиологических показателей позволяет производить качественную готовую продукцию длительного срока годности. Однако, с точки зрения технологического процесса, в научно-технической литературе, свойства СМП рассматриваются значительно более масштабно [10, 11, 20, 21, 22, 51, 52, 72, 97, 100, 110, 129, 144].

1.1.3 Сухие молочные продукты – принципы производства и переработки

Производство СМП успешно применяется для консервирования молочного сырья на протяжении уже более 100 лет. В настоящее время широко выпускаются такие СМП, как СМ, сухие сливки, сухие кисломолочные продукты, сухие смеси для детского и геродиетического питания и пр., классификация ассортимента которых представлена в работах [22, 51, 52, 72].

Основным технологическим принципом производства СМП является максимально полное удаление из продукта влаги, что достигается различными способами, из которых наиболее распространенным сегодня является непрерывная распылительная сушка, в основе которой лежит явление конвекции [52, 65].

Суть способа заключается в моментальном удалении воды из мелкодиспергированных частиц сырья при их контакте с циркулирующим горячим сухим воздухом, в результате чего образуются сухие частицы продукта со средним диаметром 50 мкм, либо агломерированные частицы со средним размером от 100 до 250 мкм и более [50].

Получаемая полидисперсная система характеризуется множеством показателей, как-то наличие пригорелых частиц, состав белка и преобразования их, а также других компонентов в зависимости от величины и продолжительности теплового воздействия на продукт, которые не нормируются.

Значимое место среди СМП занимает сухое молоко (СМ), обобщенная технология производства которого представлена на рисунке 1 [22].

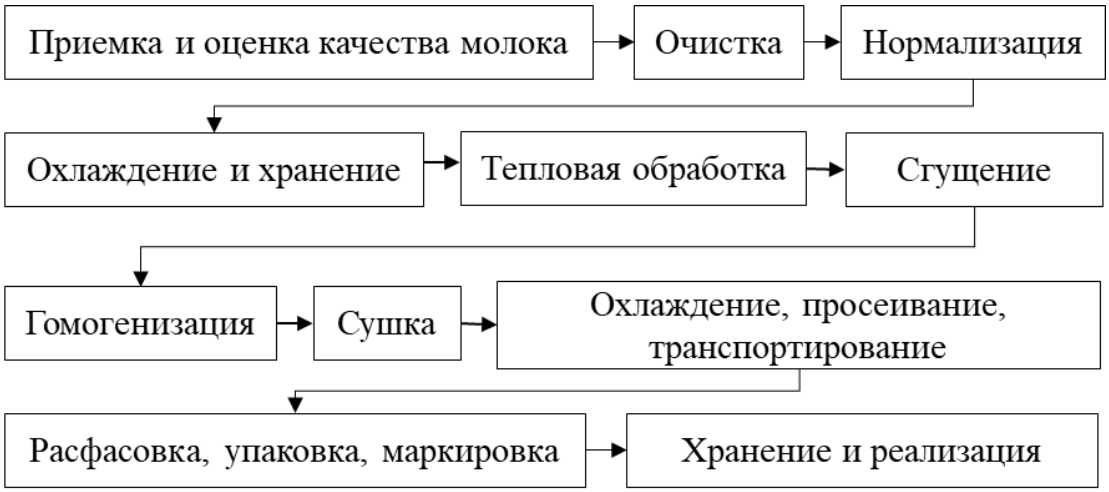


Рисунок 1 – Технологическая схема производства сухого молока

В виду отсутствия расширенных характеристик, предопределяющих качество СМ, как сырье для дальнейшей переработки оно не ранжируется.

Основные объемы СМ в мире перерабатываются в производстве восстановленного и рекомбинированного молока, технологическая цепочка которых включает их предварительную регидратацию. Процессы, протекающие при растворении СМП в воде, подразумевают изменения свойств систем. Они систематизированы и графически представлены на рисунке 2 [20].

Эффективность процесса восстановления СМ предопределяется качеством сырья, из которого было получено СМ, условиями его производства и хранения, а также составом используемой для восстановления воды и технологическим оформлением процесса восстановления (температура и продолжительность восстановления, деаэрация) [9, 18, 24, 51, 70, 80, 81, 84, 122, 129].

Значительное влияние на качество восстановленного молока и молочных продуктов оказывает жесткость воды. В жесткой воде процесс растворения СМ протекает медленнее, при этом повышенное содержание ионов кальция и магния снижает термоустойчивость белков. А неконтролируемое содержание нитратов, сульфатов и хлоридов может негативно сказываться на органолептических показателях восстановленных молочных продуктов. Поэтому в зависимости от вида источника, назначения воды и предъявляемых нормативных требований

подбираются методы и системы водоподготовительного оборудования на производстве [7, 17, 70, 96].

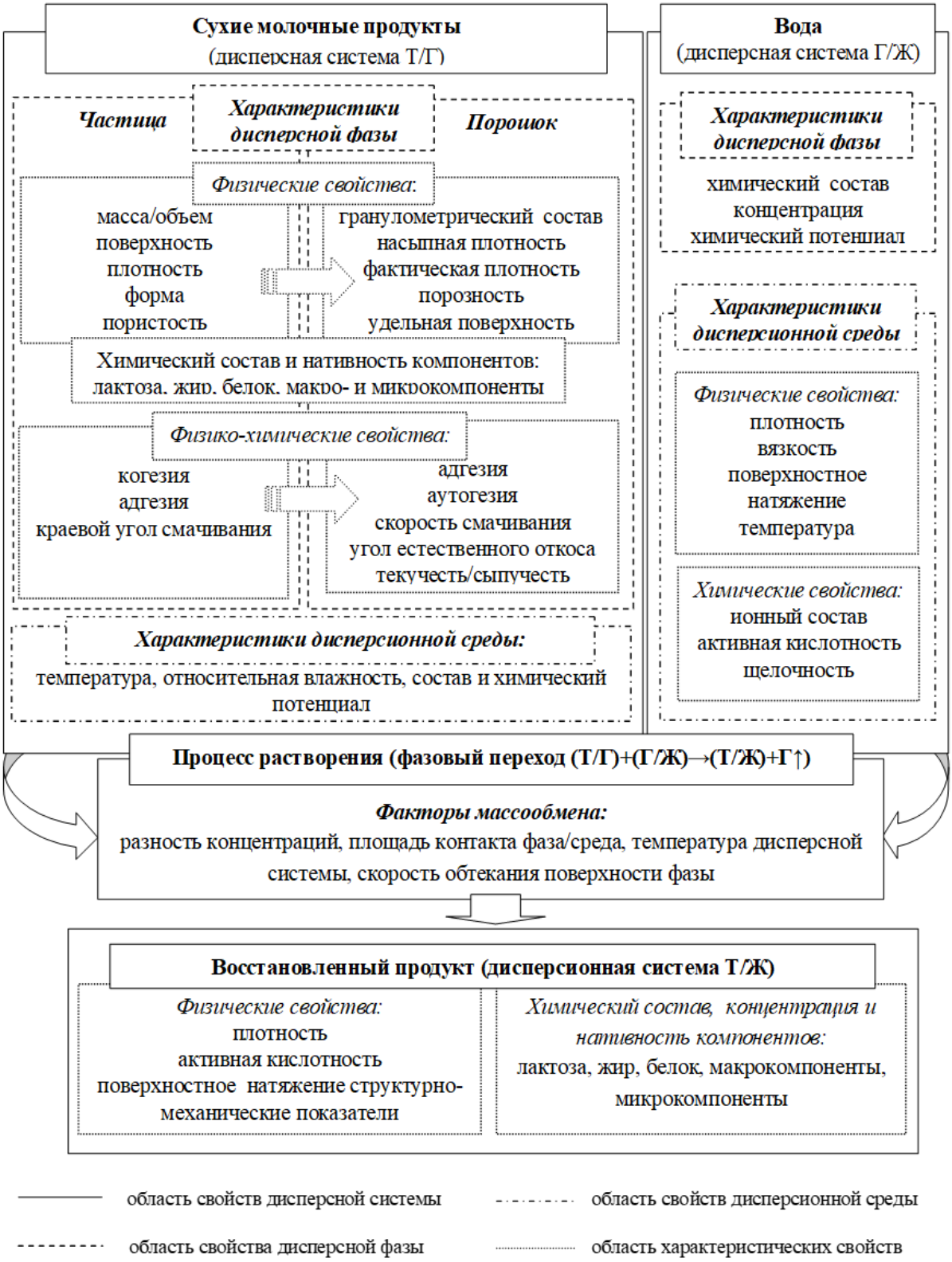


Рисунок 2 – Процесс растворения СМП с позиции взаимодействия дисперсных систем и группирование предопределяющих его свойств

1.2 Факторы формирования качества и функционально-технологических свойств молочного сырья

К функционально-технологическим свойствам сырого и СМ, оказывающим наибольшее влияние на показатели качества готовой продукции и экономическую целесообразность его переработки, относятся термоустойчивость (ТУ) молока и способность с сычужному свёртыванию (ССС) как критерию сыропригодности.

В научно-технической литературе используют различные синонимы термина «термоустойчивость»: «теплоустойчивость», «термостабильность», «теплостабильность». Под данным термином подразумевают способность молока выдерживать высокотемпературную обработку (115-140°С) с сохранением первоначальных коллоидно-дисперсных свойств белков. Поскольку доля термостойкого молока, пригодного к воздействию высоких температур, составляет для разных регионов РФ в летне-осенний период от 60% до 80% (для зимне-весенних месяцев еще ниже), внимание отечественных и зарубежных исследователей в числе прочего сконцентрировано на изучении механизма тепловой коагуляции белков и факторах, оказывающих влияние на стабильность системы, а также проблеме повышения ее тепловой устойчивости при нагревании. Рядом ученых установлена зависимость между ТУ молока и его белковым и минеральным составами, создана и развита теория солевого равновесия, согласно которой основным фактором устойчивости молока к нагреванию является его минеральный состав [12, 41, 125].

Так как механизм процесса тепловой коагуляции белков молока до сих пор полностью не установлен, а стабильность молока при нагревании характеризуется совокупностью ряда факторов (активная кислотность, концентрация свободных ионов кальция, магния, фосфора, цитратов, массовая доля белка и отдельных белковых составляющих, степень гидратации белков и пр.), отсутствует единый метод определения ТУ, который мог бы учесть все нюансы изменчивости системы в целом. Поэтому исследователями предлагаются различные методы, между которыми не выявлено полного соответствия или корреляции [8, 41, 132].

Из разнообразных методов определения ТУ, основанных на воздействии разного рода денатурирующих агентов (спирт, кислота, хлористый кальций и др.) на белковую фракцию молока, только алкогольная проба (АП) является стандартизированной методикой ввиду простоты и высокой скорости исполнения.

Однако более надежным и объективным методом, позволяющим измерить непосредственно стабильность белков молока под воздействием высоких температур без дополнительно вносимых денатурирующих веществ, является тепловая проба (ТП). Из-за сложного аппаратурного оформления и длительности измерения данная методика не может быть реализована в производстве, а применима лишь в качестве арбитражного метода.

Описанные методы базируются на визуальной оценке ТУ молока, тогда как с целью нивелирования субъективности были разработаны и инструментальные методы, не нашедшие широкого практического применения.

В сыроделии, производстве кисломолочных продуктов и казеина преднамеренная и направленная коагуляция белков молока различной интенсивности является элементом технологической цепочки. Способность молока свертываться под действием сычужного фермента с образованием плотного сгустка, хорошо отделяющего сыворотку с минимальными потерями жира и белка, представляет собой ведущий показатель сыропригодности молока [2, 78].

Одним из основных методов определения сыропригодности молока, прошедшего предварительную температурную обработку, является сычужная проба, основанная на визуальной оценке получаемого под воздействием сычужного фермента молочного сгустка [78].

ТУ и ССС молока являются широко вариативными признаками. При этом условно выделяют три направления оптимизации данных свойств СМ:

- генетическое (порода, генотип животного и др.);

- паратипическое (технологии выращивания и кормления, сезон года, период лактации, возраст животного и др.);

- технологическое (превентивно-корректирующее регулирование свойств сырого молока в процессе его переработки) [71, 74].

Производство СМ, в виду высокой производительности оборудования, требует резервирования больших объемов сырого молока – живой и динамичной биосистемы. Поэтому сырое молоко после дойки необходимо очищать (бактофугирование при температуре 65-75ºС; многоступенчатая микрофильтрация) и пастеризовать (предварительная термизация непосредственно после получения сырья) для исключения микробиологических и ферментативных процессов. При получении молока необходимо соблюдать санитарно-гигиенические условия, а также важно не допускать повторного заражения обработанного молока микрофлорой [74].

В ряде научных работ для улучшения функционально-технологических свойств СМ изучалось применение в технологии различных солей – стабилизаторов отдельно и в комплексе с предварительной пастеризацией молока.

Результаты исследований показали, что среди таких солей, как цитраты, фосфаты натрия и полифосфаты, наибольшей эффективностью обладали последние [24, 74]. При этом в большей степени повышение термостабильности было установлено при апробации технологических схем, включающих тепловую обработку молока [19].

Представляют интерес работы по повышению ТУ молока с применением молочных белковых концентратов (МБК), характеризующихся высокой стабильностью, способных повышать буферность концентрированных молочных систем [118].

Вместе с тем одним из важных этапов формирования технологических свойств СМ является тепловая обработка молока до сгущения и сушки. На основе отношения разницы содержания общего белка и суммы сывороточных белков к содержанию общего белка при pH = 4,9 различают 6 тепловых классов СМ: сверхнизкий (>6,0 мг/г, режим <70°С/15с), низкий (>6,0 мг/г, режим 70°С/15с), среднетемпературный (5,9–4,5 мг/г, режим 85–90°С/20–30с), выше среднего (4,4–1,5 мг/г, режим 90–124°С/0–30с), высокий (<1,4 мг/г, режим 110–135°С/30с), сверхвысокий (<1,4 мг/г, режим>135°С/30с). Чем ниже температурная обработка исходного молока, тем выше биологическая ценность СМ за счет сохранения

большего количества физиологически значимых компонентов, в частности сывороточных белков. Как следствие, использование СМ высокого и сверхвысокого теплового класса нежелательно к применению в сыроделии. Но в тоже время СМ низко- и среднетемпературного и выше тепловых классов является хорошим сырьем в производстве питьевых и сгущенных стерилизованных молочных продуктов за счет его повышенной термоустойчивости, а молоко высокого и сверхвысокого теплового класса применимо в производстве концентрированного молока [46, 74, 83].

Многочисленными исследованиями установлена зависимость качества молока, поступающего на сушку, от сезона года, возраста и периода лактации животного, условий его содержания и кормления и т.д. [2, 4-6, 34, 38, 45, 48, 77, 90, 103].

Так длительный дисбаланс в питании животных, несбалансированность углеводных, витаминных и минеральных компонентов, может приводить к снижению ТУ молока. Тогда как ее повышению способствует пастбищное содержание коров или использование при круглогодичном стойловом содержании зеленой подкормки [64]. К примеру, коры березы в дозе 10 г на 1 кг живой массы, приводящей спустя 7 дней приема к повышению термоустойчивости с III до I группы [64]. Также установлено, что положительное влияние на тепловую стабильность молока оказывает содержание в рационе коров препаратов пробиотического действия, например, ассоциированной культуры молочнокислых бактерий [5]. Введение в рацион буферных смесей, белковых, витаминных, минеральных концентратов по отдельности или в виде комплексных добавок также повышает термостабильность молока [8].

Известно, что качество и количество получаемого молока носят сезонный характер. В период с января по апрель в молоке наблюдается постепенное снижение процентного содержания жира и белка, тогда как наиболее полноценным и богатым составом отличается молоко в осенние месяцы [55]. В виду чего, даже при соблюдении равных условий в кормлении и содержании животных, получаемое летом и зимой молоко в сравнении с молоком весеннего периода,

характеризуется лучшими технологическими свойствами, в частности, более хорошей свертываемостью, интенсивным синерезисом, повышенным выходом сыра [55].

Для производства молочной продукции законодательно регламентировано использование сырого молока, полученного от здоровых коров спустя 7 дней после отела и за 5 дней до запуска. Выявлено, что молоко коров голштинской породы татарстанского типа в течение лактации обладало наибольшей термостабильностью в течение 4-го месяца лактации, а наименьшей – в течение 10-го месяца. Наивысшая доля термоустойчивого молока (87,5-100%), отнесенного к I и II группам, наблюдалась в период 7-го месяца. При этом отмечена устойчивая отрицательная корреляция между лактационной изменчивостью молока по ТУ и содержанием в нем как белка в целом, так и отдельных его фракций [6]. Независимо от породы коров и их помесей разного генотипа молоко, полученное за 15 дней до запуска, не выдерживает теплового воздействия, необходимого для получения стерилизованной молочной продукции [58].

Существенное влияние на удои оказывает способ содержания и кратность доения коров, которые приобретают особое значение в высокопродуктивных стадах. Установлено, что трехкратное доение по сравнению с двукратным повышает удои за лактацию на 15-18%, независимо от системы содержания (привязной или беспривязной). При этом трехкратное доение положительно влияет на естественную резистентность молочной железы, что выражается в более низком содержании соматических клеток в молоке. При трехкратном доении доля коров с содержанием соматических клеток более 1 х 10^6 составляет всего 2,6%, тогда как при двукратном – 6%. К концу лактации содержание соматических клеток повышается независимо от кратности доения [53].

Существенное повышение содержания соматических клеток в молоке является признаком заболевания животного маститом, что сопровождается нарушением секреции молока, снижением удоя, уменьшением содержания в молоке общего содержания белков (до 40%), казеинов (до 65%), лактозы, жира, кальция и фосфора, с одновременным повышением содержания сывороточных

белков, хлора и натрия. Изменяется соотношение казеинов и сывороточных белков (с 79:21 до 45:55, соответственно) [133]. Как следствие, значительно ухудшаются технологические свойства молока, которое становится непригодным для производства [29].

На протяжении многих лет селекционная работа отечественного скотоводства велась на увеличение показателя процентного содержания жира в молоке [36, 49]. В связи с увеличением объемов производства питьевого молока и сыров в России и возросшими требованиями перерабатывающей промышленности к качеству сырья при закупках большое значение приобрело содержание белка в молоке и его пригодность к переработке.

При оценке влияния различных генетических и паратипических факторов на содержание жира и белка в молоке и его технологические свойства большинство авторов на первое место ставит генетические факторы, среди которых ранее активно изучались порода и скрещивание животных [23, 34, 40, 55, 57] и т.д., а в последнее время – их генотип по полиморфным генам белков, гормонов и ферментов молока по отдельности и в комплексах [13, 39, 44, 48, 56, 60, 61, 85, 99, 101, 116, 130].

Одним из наиболее функциональных маркеров, определяющих технологические свойства молока КРС, на основании многочисленных исследований отечественных и зарубежных ученых, признан ген ϰ-казеина (*CSN3)* [3, 54, 94, 102].

Первоначально поликомпонентную белковую систему молока изучали, используя различную растворимость белков в водных, солевых и спиртовых растворах. При этом фракционный состав отдельных групп белков, в том числе наименьшей из казеиновых фракций – ϰ-казеина, удалось выявить и изучить с внедрением в практику электрофоретических методов анализа. Которые также оказались востребованными в работе с аллельным полиморфизмом каждой выявленной фракции. Так аллельный полиморфизм гена *CSN3* изучался методом изоэлектрофокусирования – был выделен аллель *D*. А также методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле – был выделен аллель *C*. Как выяснилось

в последующем это были идентичные аллели, в виду проблем с идентификацией получаемых электрофоретическими методами результатов [2].

На смену электрофорезу пришел метод анализа длин рестрикционных фрагментов с использованием блот-гибридизации, а затем широко популяризованная полимеразная цепная реакция (ПЦР) [127], которая, как и предыдущий метод, базировалась на амплификации (увеличении числа копий ДНК) экзона IV гена *CSN3*, содержащего аллельные замены, выявляемые в дальнейшем с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [138, 146]. Для его проведения в реакционную смесь вносятся эндонуклеазы рестрикции, реагирующие на сайты узнавания в исследуемом фрагменте ДНК с образованием определенного количества фрагментов фиксированного размера, разделяемых в дальнейшем в соответствии с молекулярными массами при помощи электрофореза [2, 105]. В настоящее время предложены различные модификации описанных методов исследований, к примеру, стало возможным совмещение детекции и количественного анализа специфической последовательности ДНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации с внедрением метода *Real-Time PCR* [15, 16, 95].

С начала 70 годов ген *CSN3* был подробно изучен. Его полная первичная аминокислотная структура состоит из 169 аминокислотных остатков молекулярной массой 19,037 кДа. Ген располагается в 6 (6q31) хромосоме, состоит из 5 экзонов и 4 интронов. Разными учеными идентифицированы от 4 до 15 аллелей гена *CSN3* [48, 93, 105, 107, 111, 112, 119, 135, 139, 146]. При этом как в зарубежных, так и в отечественных стадах наиболее часто встречаются аллели *A* и *B* гена *CSN3*, различающиеся двумя аминокислотными заменами: Thr^{136}→ Ile и Asp^{148}→ Ala [107] или Thr^{157}→ Ile и Asp^{169}→ Ala [119].

Большинство авторов по итогам своих исследований свидетельствует о том, что молоко от коров с генотипом *AA* по *CSN3* бывает более термоустойчивым, тогда как молоко от коров с *BB* генотипом характеризуется более высоким содержанием жира, белка, сухих веществ и лучшими сыродельческими

свойствами; при этом ТУ и сыропригодность молока исследователи находят взаимоисключающими свойствами [113, 124, 126, 136, 150].

Так, изучение молока коров поволжского типа красно-пестрой породы молочного скота в Республике Мордовия показало, что удой коров с генотипом *BB* превышал удой животных с генотипом *AA* на 643,7 кг, при этом молоко гомозиготных коров с генотипом *BB* было более сыропригодным, в виду большего содержания жира (на 43,51 кг) и белка (на 0,22%) [86].

Исследование симментальской породы на Алтае выявило, что молоко коров с генотипом *BB* отличалось более высоким содержанием белка (на 0,1…0,18 %), в виду чего из него был получен больший выход сыров типа «Витязь» и «Домашний» с лучшими вкусовыми качествами по сравнению с другими образцами [26].

Углубленный анализ скота румынской симментальской породы показал, что для локуса гена *CSN3* высокая продуктивность коров была ассоциирована с генотипами *AA* и *AB*. Вместе с тем генотип *AA* положительно коррелировал с содержанием жира в молоке, а генотип *BB* – с содержанием белка [137].

Положительное влияние генотипа *BB* по гену *CSN3* наблюдалось при выработке творога из молока колумбийских коров голштинской породы [152].

Проведенные исследования по изучению молока коров черно-пестрой породы в Самарской области выявили превосходство коров с генотипом *BB* над сверстницами с генотипами *AA* и *AB* по уровню удоя – на 184 кг и 166 кг, соответственно. Наряду с этим, наличие в геноме коров аллеля *B CSN3* отражалось в повышенном содержании жира (на 0,12-0,22%) и белка (на 0,12-0,25%) в молоке, что сказывалось на времени коагуляции молока (уменьшалось на 3-9 минут), плотности и упругости получаемого сгустка. Из такого молока получался йогурт с однородным плотным сгустком, без явного синерезиса [28].

Исследованиями молока ярославских чистопородных коров установлено, что выход творога из молока коров с генотипами *BB* и *AB* по гену *CSN3* был выше, чем из молока животных с генотипом *AA* на 14-29%, что повышало рентабельность производства творога на 37-77% [55].

Данные результаты подтверждаются и другой работой [105], в рамках которой проводилось сравнение молока ярославских чистопородных и голштинизированных коров с аллельными вариантами *A* и *B* по гену *CSN3*. На основании проведенных экспериментов было отмечено, что по химическому составу наилучшим оказалось молоко ярославских чистопородных коров с генотипом *BB* по гену *CSN3*. При этом молоко и ярославских и коров выведенного михайловского типа относилось к I классу в рамках определения сыропригодности и давало потенциальный экономический эффект: экономия 12 руб. на 1 кг сыра при использовании молока коров михайловского типа с генотипом *AB* и 8,1 руб. на 1 кг сыра – при его изготовлении из молока ярославских чистопородных коров с генотипом *BB*.

При этом в научном сообществе существуют и противоположные результаты, что по мнению ученых может быть связано с дифференциацией исследуемых выборок животных, объемами технологических выработок в рамках эксперимента и т.д. [108, 140].

Так исследование взаимосвязи полиморфизма гена *CSN3* и молочной продуктивности голштино-фризских коров в Польше показало, что наибольшее количество (6414 кг) высокоценного молока (217 кг жира и 209 кг белка) давали животные с генотипом *AA* [145].

Анализ ТУ и сыропригодности молока симментальских и голштинских коров выявил, что генотип *AA* был ассоциирован с большим выходом молока, а генотип *BB* – с большим содержанием белка в молоке. Однако в работе [116] авторы отмечают, что молоко коров с генотипом *BB* лучше выдерживало алкогольную пробу и хуже коагулировало, тогда как лучшей сыропригодностью характеризовалось молоко животных с генотипом *A1A1* по гену *CSN2*.

При исследовании коров черно-пестрой породы Московской области молоко животных с генотипом *BB* по гену *CSN3* имело лучшую плотность и ТУ, а также наименьшее время свертывания и оптимальное качество сгустка в виду большего содержания жира (на 0,05-0,11%) и белка (на 0,02-0,25%) по отношению к молоку коров, с генотипом *AA* [2].

При изучении малочисленной молочной породы Реджиана на севере Италии, чье молоко используется в производстве твердого сыра Пармиджано Реджано, не было обнаружено никакого положительного эффекта аллеля *B* гена *CSN3* на качество молока [120]. В виду того, что в исследовании использовалось сразу несколько ДНК-маркеров, ассоциированных согласно научно-технической литературе с хозяйственно-полезными признаками молока КРС, авторами была выдвинута гипотеза об антагонистическом действии генов других фракций казеинов, требующая дальнейших исследований в данной области с более полным анализом гаплотипов казеина.

Вместе с тем актуально изучение влияния комплексных генотипов полиморфных генов белков (генов альфа S1-казеина (*CSN1S1*), бета-казеина (*CSN2*), *CSN3*, бета-лактоглобулина (*BLG*), альфа-лактальбумина *(LALBA*)), фермента (гена диацилглицерол О-ацилтрансферазы) и гормонов (генов пролактина, соматотропина, лептина, тиреоглобулина) на молочную продуктивность и качество молока у КРС [62, 134, 148].

В частности, оценка чистопородных и помесных отечественных быков голштинской породы через близлежащих женских предков показала, что более высокую оценку по происхождению имели животные с генотипами *BC* гена *CSN1S1*, *AA* гена *CSN2*, *AB* и *BB* гена *CSN3*, *AA* и *AB* гена *BLG*, *AA* гена *LALBA* по сравнению с аналогами других генотипов [149].

Анализ влияния комплексных генотипов *CSN2/CSN3* на качественные и технологические характеристики молока итальянских коров голштинской породы показал, что при наличии хотя бы одного аллеля *B* в комплексном генотипе улучшается сычужная свертываемость молока [117].

Приведенные результаты по работе с итальянской голштинской породой нашли подтверждение и в работе других авторов [141], в которой были изучены комплексные генотипы животных с учетом генов *CSN1S1, CSN2* и *CSN3*. Самое высокое содержание жира наблюдалось в молоке коров с генотипом *BB-A1A1-AA* (4,01 г / 100 г), соответственно, тогда как молоко коров с генотипом *BB-A2A2-BB* имело более высокое содержание белка, лучшие характеристики коагуляции и

наибольший выход сгустка, а также хорошую способность удерживать жир и белок в нем.

Исследование коров черно-пестрой и бестужевской пород выявило, что при одновременном учете генотипов коров по генам альфа-лактоальбумина и бета-лактоглобулина наибольшими удоями, а также лучшей ТУ и ССС обладало молоко коров с генотипами *BB/BB* и *BB/AB*. Вместе с тем молоко коров с генотипами *AB/AA* и *AB/AB* характеризовалось наибольшим содержанием жира, белков, лактозы, минеральных веществ [75].

Эти и другие работы показывают высокую значимость оценки животных и получаемого от них молока-сырья с точки зрения наличия и преобладания желательных аллелей гена *CSN3*. Научные подходы и методики постоянно совершенствуются, что позволяет в будущем рассчитывать на достоверную и универсальную методику определения технологических свойств молока для его рациональной переработки [79, 131]. При этом основной массив современных данных получен и интерпретирован в абсолютном большинстве случаев применительно к молоку от индивидуального животного.

1.3 Стерилизованные молочные продукты

Стерилизация – базовый наукоемкий процесс большинства пищевых производств, применяемый с целью минимизации либо полного подавления различных видов порчи пищевых продуктов. Различают лучевой, радиационный, механический, химический и тепловой способы стерилизации, применяя их как к продукту, так и к помещениям, оборудованию, таре и др. Так, на молочных предприятиях используется лучевая стерилизация в виде ультрафиолетового облучения для обеззараживания внутренних поверхностей тары, производственных площадей и воздуха рабочих помещений. Различное аппаратурное оформление механической стерилизации - для полноты очистки молока. Химическая стерилизация, выражающаяся во внесении в технологии консервантов различной природы, - для повышения качества и технологической

пригодности молока. Среди всех способов стерилизации для промышленной обработки молока наиболее широкое применение получил тепловой способ стерилизации [22].

Стерилизация молочных продуктов сегодня реализуется при различных температурных режимах, подбираемых под ассортимент производства, двумя основными способами: в таре (115-120 °С; 20-30 минут) и в потоке (прямая или косвенная ультравысокотемпературная (УВТ) обработка в закрытой системе при 135-140 °С в течение 2-6 секунд) [83, 89]. Благодаря экспозиции при высоких температурах снижается микробиологическая обсемененность молока, инактивируются ферменты, характерные для молока-сырья, в результате чего срок годности продуктов, классифицированных в работах [22, 83, 147], повышается до 6-ти месяцев. Вследствие этого, стерилизованные молочные продукты, по аналогии с СМ, могут быть реализованы производителями вдали от непосредственного производства; существенно упрощается их транспортировка и хранение, так как отпадает потребность в дорогостоящем холодильном оборудовании [1, 115].

Среди стерилизованных молочных продуктов широкое распространение получило сгущенное стерилизованное молоко [72, 83, 89].

В России доля питьевого молока длительного хранения непрерывно растет в общем объеме потребляемых жидких молочных продуктов. Что является ожидаемым с учетом лояльности потребителей к гарантировано безопасным продуктам питания в различной упаковке, в том числе удобной для потребления в современном ускоренном темпе жизни, а также в условиях пандемии [1, 128]. Основными производителями стерилизованного молока сегодня в стране являются крупные компании «PepsiCo», «Данон», «Галактика», «КОМОС ГРУПП», «Parmalat», «Молвест».

В производстве стерилизованных молочных продуктов особенно важно, чтобы перерабатываемое молоко имело низкое содержание микроорганизмов в целом и бактериальных спор, в частности, так как в ходе тепловой обработки молока микроорганизмы погибают не одномоментно, а согласно логарифмической функции. В производстве практически невозможно добиться полной стерилизации

продукта, поэтому ее оценивают по показателю эффективности стерилизации [83] по формуле:

$$K \times t = log \frac{N}{N_t}, \quad (1)$$

где K – константа, t – время обработки молока, N – количество спор, первоначально присутствующих в сыром молоке, N_t – количество спор в стерилизованном молоке после заданного времени обработки t.

Данный показатель непосредственно взаимосвязан с термином «промышленная стерильность», характеризующим удаление из продукта микроорганизмов, способных к росту при нормальных неохлаждаемых температурных режимах [83, 89].

Чем выше температура и продолжительнее время выдержки, тем выше эффективность стерилизации, при этом важным фактором влияния на процесс является термостойкость определяемых в молоке микроорганизмов (*Bacillus stearothermophilus, Clostridium botulinum*). Совокупное влияние времени и температуры на стерилизацию спор микроорганизмов выражается через значение F_0 в минутах для *Clostridium botulinum* и аналогичные значения F для других микроорганизмов по формулам, приведенным у авторов [83], также описывающих другие параметры стерилизационной обработки.

Длительное воздействие высокой температуры на молоко приводит и к нежелательным химическим преобразованиям: потемнению, разрушению витаминов и аминокислот, частичной денатурации сывороточных белков и осаждению солей, изомеризации лактозы с образованием лактулозы и промежуточных продуктов реакции (фурозина и пиридозина) [68].

Недостаточное температурное воздействие не позволяет обеспечивать неизменность свойств готового продукта при хранении [31, 106, 115, 151]. Поэтому сегодня актуальны и востребованы научные изыскания путей оптимизации технологической обработки молока с целью повышения качества молока и молочных напитков.

Заключение по обзору литературы

Обобщая представленный материал, можно констатировать, что любые процессы в рамках технологии предполагают изменения нативных свойств молока. При этом однозначных данных по влиянию технологических процессов на изменения в физико-химическом составе молока, как, впрочем, и оценочных критериев не существует. Это обусловлено сложным и изменчивым составом молока, множеством инициируемых процессов абиогенной и биогенной трансформации, сложно моделируемыми наложениями термомеханических нагрузок и др. Сегодня ввиду существенных изменений в развитии производственных схем большинство исследователей склонны оперировать интегральными показателями, а также расширять область оценочных критериев современными характеристиками. Особый интерес представляют научные работы по изучению технологических свойств молока с привлечением современных молекулярно-генетических методов диагностики. Во многих странах используют генетические маркеры, которые связаны с количественным выходом, а также качественными признаками и технологическими свойствами молока коров. Вместе с тем в научном сообществе наблюдаются разные точки зрения, касательно того, как именно функционально-технологические свойства ассоциированы с полиморфными генами молочных белков, в частности, с геном *CSN3*. Доказательство той или иной ассоциации ДНК-маркера с технологическими свойствами молока может быть получено проведением дальнейших крупномасштабных исследований в рамках селекционного развития молочного животноводства страны. Либо внедрением концептуально новых методов контроля качества сырья на производстве.

ГЛАВА 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

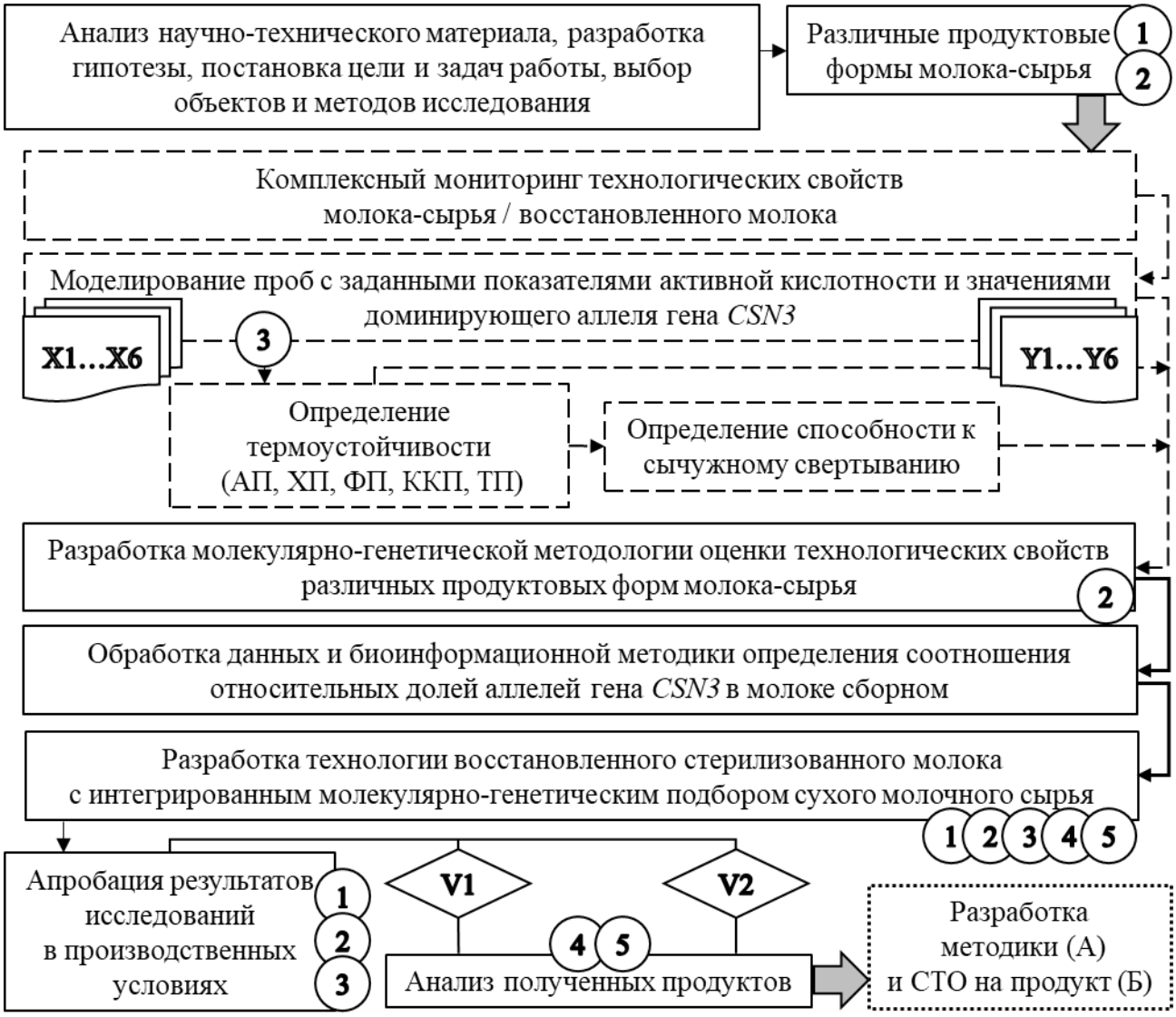
Работа выполнена в лаборатории молочных консервов ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» в период 2019 – 2021 гг.

Структура исследований диссертационной работы включала теоретические и экспериментальные этапы и состояла из следующих основных блоков: поиск и анализ научно-технической литературы и патентной информации в фокусе изучаемых вопросов, в том числе с помощью ресурсов Интернет; разработка научной гипотезы, алгоритма исследований, выбор методов контроля анализируемых величин; проведение комплекса исследований и анализ полученного экспериментального материала; разработка методики совмещенного молекулярно-генетического и биоинформационного анализа и его освоение; рекомендации по практическому применению результатов исследований; создание технологии восстановленного стерилизованного молока из сухого молока с интегрированным методом молекулярно-генетической оценки сырья.

Часть исследований, на уровне консультаций и проведения специфичных анализов, с применением современных молекулярно-генетических, биохимический, биофизических методов, проводилась в творческом сотрудничестве со специалистами межотраслевого научно-технического центра мониторинга качества пищевых продуктов Всероссийского научно-исследовательского института пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН с четким разделением объектов интеллектуальной собственности.

Апробацию результатов научно-исследовательской работы осуществляли в испытательной лаборатории «Молоко» ФГАНУ «ВНИМИ», испытательном центре ВНИИТеК – филиале ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, АО МК «Воронежский», ООО «Итальянские традиции» и ООО «НОВАЯ ИЗИДА».

Схема проведения исследований приведена на рисунке 3.



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 последовательностей стерилизации восстановленного молока; 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 сухого молока.

Рисунок 3 – Общая схема исследований

2.1.1 Физико-химический анализ образцов

В рамках расширенного физико-химического анализа образцов исследовались следующие показатели:

- массовая доля влаги в молоке термогравиметрическими методами в соответствии с ГОСТ Р 54668-2011 и ГОСТ 29246-91;

- массовая доля СОМО по ГОСТ Р 54761-2011;

- массовая доля белка путем определения массовой доли общего азота по методу Кьельдаля с последующим пересчетом на белок по ГОСТ 23327-98 на анализаторе белка Kjeltec-2400 Auto Analyzer, «Foss Electric», Дания;

- содержание небелкового азота методом осаждения белковых азотистых веществ трихлоруксусной кислотой с последующим измерением общего азота в фильтрате по ГОСТ Р 55246-2012;

- содержание казеиновых белков методом кислотного осаждения казеина и измерения общего азота в фильтрате по ISO 17997-1 / IDF 29-1;

- содержание сывороточных белков по ГОСТ Р 54756-2011;

- массовая доля жира по методу Гербера в соответствии с ГОСТ 5867-90;

- массовая доля лактозы поляриметрическим методом в соответствии ГОСТ Р 54667-2011;

- активную кислотность по ГОСТ 32892-2014;

- титруемую кислотность по ГОСТ Р 54669-2011;

- содержание Са титриметрическим методом по ГОСТ Р 55331-2012;

- аминокислотный состав методом капиллярного электрофореза (КЭФ) на системе «Капель 205М» (Люмекс, Россия).

2.1.2 Восстановление сухого молока

Образцы СМ восстанавливали дистиллированной кипяченой водой с pH (6,5±0,1) и температурой (40±2) ºС, в которую вносили навески молока согласно заданным экспериментальным параметрам. Перемешивание образцов производили

с помощью лабораторного магнитного устройства при скорости вращения 500 мин$^{-1}$. Образцы гидратировали в течение 15 минут с последующим охлаждением до температуры (20±2) ºС [84].

2.1.3 Пробоподготовка образцов для оценки термоустойчивости

В начале экспериментов определяли буферную емкость молока по кислоте и щелочи для нивелирования влияния на термоустойчивость молочных белков таких показателей как активная и титруемая кислотность. Затем осуществляли моделирование экспериментальных проб с диапазоном pH 6,0 – 7,0 с шагом 0,2.

Активную кислотность (pH) определяли потенциометрическим методом с использованием лабораторного прецизионного pH-метра InoLab pH Level 1, оснащенного комбинированным pH-электродом Sen Tix 61 с датчиком температуры для измерения pH в диапазоне 0…14. Также для сопоставления с показателями pH и результатами определения термостойкости измеряли титруемую кислотность всех образцов.

2.1.4 Определение термоустойчивости по алкогольной, хлоркальциевой, фосфатной, кислотно-кипятильной и тепловой пробам

Для наиболее полного и точного определения ТУ молока в работе использовались различные методы ее исследования: алкогольная (АП), хлоркальциевая (ХП), фосфатная (ФП), кислотно-кипятильная (ККП) и тепловая (ТП) пробы [41].

Оценку ТУ молока по АП проводили в соответствии с ГОСТ 25228-82. Метод основан на способности растворов этилового спирта осаждать протеины молока. В работе также использовали модифицированную во ФГАНУ «ВНИМИ» версию стандарта, предусматривающую расширенную линейку концентраций спиртовых растворов: 68%, 70%, 72%, 75%, 80%, 85%, 90% и 95%. Согласно методу, к 2 см^3 образца, помещенного в чашку Петри, пипеткой добавляется 2 см^3 спирта

определенной концентрации, смесь перемешивается круговыми движениями. По истечению 2 минут фиксируется наличие или отсутствие изменений консистенции исследуемой смеси. Коагуляция белков в виде визуально различимых хлопьев соответствует пониженной ТУ.

Оценку ТУ молока по ХП проводили внесением в образцы избыточного количества ионов кальция с последующим тепловым воздействием. В работе используются стеклянные термостойкие флаконы (НС-3) диаметром 22 мм, высотой 55 мм и номинальной вместимостью 10 $см^3$ с резиновыми пробками, компактная водяная баню-ковш (WB) для флаконов НС-3 с прижимным винтом для фиксации пробок. Во флаконы вносится по 10 $см^3$ проб с температурой (20±2) ºС и по 0,5 $см^3$ 1%-ного раствора $CaCl_2$. Объем бани быстро заполняется кипящей водой, после чего ковш незамедлительно переносится на разогретую электрическую плитку для поддержания кипения. В таком состоянии пробы выдерживаются 4 минуты при (100±1) ºС, затем в емкость бани без замедления подается холодная вода до достижения температуры образцов (20±2) ºС. Для визуализации результатов содержимое флаконов переносится в чашки Петри, где определяется наличие в них хлопьев белка.

Оценку ТУ молока по ФП проводили путем внесения к пробам молока раствора KH_2PO_4 для смещения солевого баланса по содержанию фосфора с последующим тепловым воздействием. Для этого во флаконы НС-3 с 10 мл молока вносится по 1 $см^3$ раствора KH_2PO_4 (68,1 г на 1 л воды). Пробы выдерживаются 5 минут при (100±1) ºС. После охлаждения содержимое флаконов также переносится в чашки Петри.

Оценку ТУ молока по ККП проводили сочетанием теплового воздействия с внесением разного объема соляной кислоты. Анализ идентичен кальциевой и фосфатной пробам. Образцы выдерживаются по 3 минуты при (100±1) ºС. Затем флаконы охлаждаются, фиксируются те, в которых произошла коагуляция. Уровень стабильности белковой фракции характеризуется количеством внесенной соляной кислоты.

Оценку ТУ молока по тепловой пробе проводили при помощи опытного образца устройства контроля ТУ УКТ-150, разработанного специалистами ФГАНУ «ВНИМИ». Сущность метода состоит в сравнительном анализе продолжительности коагуляции молочных белков, помещенных в глицериновую баню (ультратермостат LOIPLT-316a) при температуре (130±1)°С. В пробирки объемом 8 мл из термоустойчивого молибденового стекла вносится по 3 мл образца. Пробирки помещают в металлическую кассету-держатель устройства УКТ-150 и зажимают винтами в блоке крепления так, чтобы резиновые пробки, закрывающие пробирки, не выскакивали в процессе нагревания. Кассете-держателю шатунным механизмом сообщают периодические движения во избежание пригара на стенках пробирок. Образцы выдерживаются таким образом с фиксацией времени выдержки до начала коагуляции протеиновой фракции молока, выявляемой визуально. Для определения характера сгустка содержимое пробирок также переносится в чашки Петри. Результаты оценки записывается в минутах.

2.1.5 Определение способности к сычужному свертыванию

ССС молока как один из критериев оценки сыропригодности определяли по следующей методике.

Сычужное свертывание проводили стандартизованными молокосвертывающими ферментами, полученными из ферментативно произведенного химозина CHY-MAX M 2500 IMCU (Chr. Hansen, Denmark) и Microclerici 2400 IMCU (Sacco Sistem, Italy). Приготовление растворов ферментов осуществляли путем пересчета их активности в соответствии с активностью 1г сычужного фермента 100 тыс.ед. Навеска составляла 0,32 г для фермента активностью 2500 IMCU/г и 0,33 г для фермента активностью 2400 IMCU/г. Взвешенный молокосвертывающий препарат растворяли в 100 мл дистиллированной воды при температуре (30±1)°С и выдерживали 30 мин в магнитном перемешивающем устройстве при 300 мин$^{-1}$.

В высокие лабораторные стаканы вместимостью 100 мл, вымытые и просушенные, цилиндром отмеряли 90 см^3 сырого / восстановленного молока (ВМ) с температурой (38±1)°С. Затем в каждый стакан вносили по 3 см^3 раствора контрольного образца фермента. Пробу тщательно перемешивали и помещали в термостат, прогретый до температуры (38±1)°С. Выдержку в термостате осуществляли до формирования плотного сгустка с хорошим синерезисом. Отмечали время сычужного свертывания в минутах, учитывая интервал времени с момента внесения сычужного фермента до образования плотного сгустка, оценивали характеристику полученного сгустка.

Молоко классифицировали, ориентируясь на рекомендации [41]:

- ✓ I-хорошее (плотный сгусток с гладкой поверхностью, упругий на ощупь, без глазков на продольном разрезе, плавает в прозрачной сыворотке, которая не тянется и не горькая на вкус для сырого молока; мягкий сгусток с единичными глазками для ВМ);
- ✓ II-удовлетворительное (сгусток мягкий на ощупь с единичными глазками, рыхлый, нецельный для сырого молока; разорванный, мягкий сгусток для ВМ);
- ✓ III-неудовлетворительное (сгусток с неровной поверхностью, мягкий на ощупь, с многочисленными глазками, вспучен, дряблый или хлопьевидный для сырого молока; рыхлая масса с мутной сывороткой для ВМ).

После оценки сгустка отделившуюся сыворотку фильтровали через лавсановую ткань, применяемую в сыроделии.

Сыворотку тщательно перемешивали и определяли в ней массовую долю белка. Процентное соотношение перехода общего белка в сыворотку вычисляли по формуле:

$$R = \frac{P_S \times 100}{P_m}, \qquad (2)$$

где R – доля перехода общего белка в сыворотку, %; Ps – м. д. общего белка в сыворотке, %; Pm – м. д. общего белка в восстановленном молоке, %.

2.1.6 ПЦР-ПДРФ идентификация аллельных вариантов гена *CSN3*

Оценку полиморфизма гена *CSN3* КРС выполняли посредством совмещенной полимеразной цепной реакции с последующим определением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ анализа) [14].

Экстракцию ДНК проводили с помощью комбинированного щелочного способа из образцов крови животных [14], а также с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-С-М» ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, предназначенного для экстракции ДНК из биологического материала от животных, в частности, из молока. Проведение амплификации локуса гена *CSN3* осуществляли наборами реактивов ООО «СибЭнзим» и ЗАО «Евроген» с применением праймеров АВ1+АВ2, К1+К2 и JК5+JК3 на программируемом многоканальном амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-технология», Россия).

Оценку аллельного полиморфизма гена *CSN3* у исследуемой выборки животных проводили обработкой амплифицированного продукта эндонуклеазами рестрикции *Hinf*I и *Hind*III. Исходные и рабочие концентрации реагентов, а также поочередно вносимые объемы и используемые температурные режимы представлены в таблицах 2, 3 и 4.

Электрофоретическую детекцию образующихся ПЦР и ПЦР-ПДРФ-фрагментов проводили с использованием агарозы (Biotechnology Grade, Amresco, США) в виде 2% агарозного геля; трис-ацетатного электродного буфера (500 мл 1× ТАЕ буфера, 15 мкл 1% раствора бромистого этидия); буфера для нанесения 4X Gel Loading Dye, Blue, ЗАО «Евроген», Россия.

Для проведения детекции использовали камеру «SE-2» («Хеликон») и источник питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») с визуализацией результатов на трансиллюминаторе системы гель-документирования Gel Doc XR+ с поддержкой программного обеспечения Image Lab (Bio-Rad, США). Используемый режим электрофореза: выходное напряжение – 150 В, выходной ток – 150 мА, время электрофореза – 45 минут.

Пара праймеров AB1+AB2 инициировала амплификацию участка гена *CSN3* крупного рогатого скота длиной 453 bp, после чего эндонуклеазами рестрикции были сгенерированы ПДРФ-*Hinf*I-фрагменты (*BB* = 426/27 bp, *AA* = 326/100/27 bp и *AB* = 426/326/100/27 bp) и ПДРФ-*Hind*III-фрагменты (*BB* = 351/102 bp, *AA* = 453 bp и *AB* = 453/351/102 bp).

Пара праймеров K1+K2 инициировала амплификацию участка гена *CSN3* длиной 271 bp, преобразуемого эндонуклеазами рестрикции в ПДРФ-*Hinf*I-фрагменты (*BB* = 222/49 bp, *AA* = 131/91/49 bp и *AB* = 222/131/91/49 bp) и ПДРФ-*Hind*III-фрагменты (*BB* = 182/89 bp, *AA* = 271 bp и *AB* = 271/182/89 bp).

Пара праймеров JK5+JK3 инициировала амплификацию участка гена *CSN3* длиной 350 bp, после чего эндонуклеазой рестрикции *Hinf*I были сгенерированы ПДРФ-фрагменты: *BB* = 265/85 bp, *AA* = 134/131/85 bp и *AB* = 265/134/131/85 bp).

2.1.7 Математическая обработка экспериментальных данных

Доверительная вероятность результатов математической обработки была не ниже: для данных физико-химического анализа 0,95; результатов технологического и микробиологического экспериментов 0,90 и 0,80 соответственно. Статистическая обработка и визуализация экспериментальных данных проводилась с применением методов матричной алгебры с помощью программ «Mathematic», «Microsoft Excel», «Mat Cad», «Curve Expert» и др.

Таблица 2 – ПЦР-ПДРФ-протокол для генотипирования КРС по *CSN3*-гену с использованием праймеров AB1+AB2 и эндонуклеаз рестрикции *Hinf*I и *Hind*III

ПЦР-протокол				
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
dH_2O	-	-	14,4	144
dNTP	2,5 мМ	0,25 мМ	2	20
Буфер	10×	1×	2	20
Taq ДНК полимераза	5 ед	1 ед	0,2	2
AB1	50 мкМ	0,5 мкМ	0,2	2
AB2	50 мкМ	0,5 мкМ	0,2	2
Проба ДНК	-	-	1	10
Итого	-	-	20	200

Нуклеотидные последовательности праймеров:

AB1: 5/-TGT GCT GAG TAG GTA TCC TAG TTA TGG-3/ *ПЦР-продукт*

AB2: 5/-GCG TTG TCT TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3/ *453 bp*

Режим анализа:

×1: 94 ^{0}C – 4 мин; ×40: 94 ^{0}C – 30 с, 61 ^{0}C – 30 с, 72 ^{0}C – 30 с;

×1: 72 ^{0}C – 5 мин; хранение: 4 ^{0}C.

Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
ПДРФ-протокол с *Hinf*I				
dH_2O	-	-	2,34	23,4
SE-буфер O	10×	1×	2,5	25
*Hinf*I	30 ед	5 ед	0,16	1,6
ПЦР-проба	-	-	20	200
Итого			25	250
ПДРФ-протокол с *Hind*III				
dH_2O	-	-	2,25	22,5
SE-буфер O	10×	1×	2,5	2,5
*Hind*III	40 ед	10 ед	0,25	2,5
ПЦР-проба	-	-	20	200
Итого			25	250

Режим анализа: Инкубация при 37 ^{0}C в течение 8-12 часов

Таблица 3 – ПЦР-ПДРФ-протокол для генотипирования КРС по *CSN3*-гену с использованием праймеров К1+К2 и эндонуклеаз рестрикции *Hinf*I и *Hind*III

ПЦР-протокол				
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
dH_2O	-	-	14,4	144
dNTP	2,5 мМ	0,25 мМ	2	20
Буфер	10×	1×	2	20
Taq ДНК полимераза	5 ед	1 ед	0,2	2
К1	50 мкМ	0,5 мкМ	0,2	2
К2	50 мкМ	0,5 мкМ	0,2	2
Проба ДНК	-	-	1	10
Итого	-	-	20	200

Нуклеотидные последовательности праймеров:

К1: 5/-GAA ATC CCT ACC ATC AAT ACC-3/ *ПЦР-продукт*

К2: 5/-CCA TCT ACG CTA GTT TAG ATG-3/ *271 bp*

Режим анализа:

×1: 94 ^{0}C – 4 мин; ×40: 94 ^{0}C – 30 с, 61 ^{0}C – 30 с, 72 ^{0}C – 30 с;

×1: 72 ^{0}C – 5 мин; хранение: 4 ^{0}C.

Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
ПДРФ-протокол с *Hinf*I				
dH_2O	-	-	2,34	23,4
SE-буфер O	10×	1×	2,5	25
*Hinf*I	30 ед	5 ед	0,16	1,6
ПЦР-проба	-	-	20	200
Итого			25	250
ПДРФ-протокол с *Hind*III				
dH_2O	-	-	2,25	22,5
SE-буфер O	10×	1×	2,5	2,5
*Hind*III	40 ед	10 ед	0,25	2,5
ПЦР-проба	-	-	20	200
Итого			25	250

Режим анализа: Инкубация при 37 ^{0}C в течение 8-12 часов

Таблица 4 – ПЦР-ПДРФ-протокол для генотипирования КРС по *CSN3*-гену с использованием праймеров JK5 + JK3 и эндонуклеазы рестрикции *Hinf*I

ПЦР-протокол				
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
dH_2O	-	-	13	130
dNTP	2,5 мМ	0,25 мМ	2	20
SE буфер	10×	1×	2	20
Taq ДНК полимераза	5 ед	1 ед	0,2	2
JK5	25 мкМ	0,5 мкМ	0,4	4
JK3	25 мкМ	0,5 мкМ	0,4	4
Проба ДНК	-	-	2	20
Итого	-	-	20	200

Нуклеотидные последовательности праймеров:

JK5: 5/-FAM-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3/ *ПЦР-продукт*

JK3: 5/-GCCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA-3/ *350 bp*

Режим термоциклирования (Терцик):

×1: 94^0C – 4 мин.

×35: 94^0C – 10 сек, 63^0C – 10 сек, 72 ^{0}C – 10 сек.

×1: 72 ^{0}C – 7 мин.

Протокол ПДРФ				
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба (мкл)	10 проб (мкл)
dH_2O	-	-	12,25	122,5
SE-буфер O	10×	1×	2,5	25
*Hinf*I	20 ед	5 ед	0,25	2,5
ПЦР-проба	-	-	10	100
Итого	-	-	25	250

Режим анализа: Инкубация при 37 ^{0}C в течение 8-12 часов

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование ассоциации полиморфизма гена *CSN3* крупного рогатого скота с технологическими свойствами сырого молока

Для подтверждения преобладающего в научной литературе мнения о влиянии генотипа животного по гену *CSN3* на технологические свойства сырья проведены соответствующие исследования крови и молока отдельно взятых коров черно-пестрой, холмогорской, симментальской и бурой швицкой породы зоостанции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, ЗАО «Совхоз имени Ленина», расположенных на территории Москвы и Московской области, соответственно, а также хозяйств СХПК им. Ленина и ООО «Дусым» Атнинского района, ООО им. Тукая Балтасинского района, ОАО «Племзавод «Бирюлинский» и ООО «Серп и Молот» Высокогорского района Республики Татарстан. Суммарная выборка на всех этапах исследований насчитывала более 1100 голов здоровых животных, подобранных исходя из схожих условий содержания и кормления. Анализ материала осуществляли в единой выборке с отсевом точек с аномальными значениями. Результаты исследований при их положительной интерпретации могут быть положены в методику определения превалирующего аллеля в сборном молоке и её последующую интеграцию в практику оценки функционально-технологических свойств молока-сырья.

После ДНК-анализа выборки коров (723 голов) получено следующее распределение генотипов по гену *CSN3*: первотёлок с *AA*-генотипом 379 гол. (52,4 %), с *AB*-генотипом – 223 гол. (30,8 %) и с *BB*-генотипом – 121 гол. (16,7 %), что соответствовало имеющимся в научной литературе сведениям о встречаемости изучаемых генотипов [26, 28, 54, 105, 119].

В таблице 5 представлены результаты предварительных исследований влияния генотипа по гену *CSN3* на ССС и ТУ молока отобранных коров.

Таблица 5 – Распределение КРС по генотипу по гену *CSN3* и функционально-технологические свойства полученного от них молока

Показатель		Распределение КРС		В том числе с генотипом по гену *CSN3*					
		n = 723		*AA*, n = 379		*AB*, n = 223		*BB*, n = 121	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Класс молока	I	490	67,8	201	53,0	178	79,8	111	91,7
	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 сгустка, мин.				29,5±0,4		24,6±0,5		16,6±1,0	
Продолжительность термообработки до видимой коагуляции, мин				64,5±0,5		60,7±0,3		32,2±1,4	

Результаты исследования показали, что наилучшее с позиции продолжительности коагуляции молоко было отмечено у особей с генотипом *BB* гена *CSN3*, их молоко свёртывалось в среднем за 16,6 мин. При этом, как видно из представленной таблицы, наличие аллеля *B* гена *CSN3* в геноме первотёлок значимо повлияло на улучшение коагуляционных свойств молока. Доля гомозигот с генотипом *BB* по гену *CSN3*, у которых был казеиновый сгусток плотной консистенции, составляла 91,7%, тогда как у гетерозиготных животных с генотипом *AB* она составила 79,8%.

Проведенный анализ ТУ молока выявил, что молоко коров с генотипом *BB* по гену *CSN3* имело наименьший показатель ТУ (32,2 мин.), а с генотипами *AB* и *AA* – наибольшие показатели ТУ (64,5 мин. и 60,7 мин.).

Таким образом, предварительные исследования объединённой выборки показали, что лучшей ССС (выход плотного казеинового сгустка и наименьшая продолжительность свёртывания молока) обладало молоко от животных, имеющих в своём геноме *B* аллель гена *CSN3*. А наибольшей ТУ обладало молоко от животных, несущих в своём геноме *A* аллель гена *CSN3*. При этом все указанные результаты получены на молоке индивидуальных животных. Поскольку на молочные предприятия поступает сборное молоко, к которому правомерно отнести также СМП, полученные результаты требовали дальнейших исследований с соответствующим усложнением системы.

Усредненные данные состава сырого молока коров с генотипами *AA*, *AB* и *BB* по гену *CSN3*, используемого в рамках наработки экспериментального материала методики определения доминирующего аллеля в сборном молоке, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Данные по составу образцов сырого молока с гомозиготными генотипами *AA* и *BB* по гену *CSN3*

Наименование показателя	Сырое молоко		
	AA	*AB*	*BB*
Массовая доля влаги, %	88,23±0,6	87,94±0,8	87,46±0,7
Массовая доля СОМО, %	8,22±0,02	8,38±0,04	8,92±0,03
Массовая доля лактозы, %	4,41±0,07	4,49±0,08	4,65±0,04
Массовая доля жира, %	3,57±0,11	3,68±0,12	3,62±0,15
Массовая доля общего белка, %	3,08±0,08	3,21±0,09	3,47±0,06
Массовая доля казеиновых белков, %	2,25±0,04	2,38±0,08	2,67±0,05
Массовая доля сывороточных белков, %	0,83±0,06	0,83±0,04	0,81±0,05
Кислотность, ˚Т	17,0±0,9	17,5±0,9	18,0±1,1
Концентрация Са, мг%	93,12±1,5	107,22±0	116,40±2,1

В рамках подтверждения значимости генотипов животных по гену *CSN3* в формировании интегральных функционально-технологических показателей системы, на молоке отдельных животных смоделированы условия, с одной стороны, имитирующие избыточные технологические воздействие, а с другой, результаты которых можно использовать для консервирования проб. Для этого молоко замораживалось при неконтролируемых (скорость) условиях до температуры минус 18°С в однотипной таре при ее равном заполнении. Предполагалось, что результаты исследований по данному направлению позволят определить значимость влияния технологических процессов на интегральные показатели молока, а также осуществить наиболее щадящее консервирование сырья до момента его доставки в лабораторию в рамках разработки молекулярно-генетических и биоинформационных подходов к системе оценки технологических свойств молока.

Предшествующий экспериментам анализ научно-технической литературы показал, что под воздействием низких температур в молоке наибольшим

изменениям подвергается его жировая фракция [87]. Так при кристаллизации водной фазы молока происходит, в том числе, необратимая деформация жировых шариков с образованием свободного жира. Этот процесс способствует снижению гидрофильности макрокомпонентов, а при длительных сроках хранения - окислению жира с образованием перекисных соединений различных типов. В случае с белками изменения также зависят от интенсивности процесса, температуры замораживания и времени хранения образцов в замороженном состоянии. Ослабление гидрофобных связей казеина приводит к переходу части β-казеинов из ассоциатов в плазму с ферментативным расщеплением до γ-казеинов и компонентов протеозо-пептонной фракции [27, 87]. При этом имеются данные, что хранение нативного замороженного молока при температуре от минус 25 °С до минус 20 °С в течение нескольких дней существенно не влияет на состояние белкового комплекса [121]. Также известно [72], что замороженное молоко достаточно широко применялось в 50-х годах прошлого века в качестве сырья. Последние 2-3 года отмечено наличие существенных объемов на рынке импортируемого замороженного концентрированного молочного сырья [37].

Предварительные исследования замораживания цельного молока и последующий анализ его функционально-технологических свойств показали наличие существенных изменений. В частности, отмечалось значимое понижение ТУ и ССС. Расширялась область результатов с аномальными значениями. С учетом этого было принято решение исключить жировую фазу, что достигалось за счет сепарирования, и продолжить исследования на обезжиренном молоке.

Соответственно проведен сравнительный анализ физико-химических показателей и технологических свойств образцов сырого обезжиренного молока непосредственно после получения и пробоподготовки. Последняя предполагала выдержку не менее 6 часов при (4±2)°С с момента окончания доения для гарантированного снижения бактерицидной активности. Маркировка данной группы образцов - «Н» (нативное) с цифровым индексом, соответствующем порядковому номеру образца. Маркировка образцов после замораживания, хранения (минус (20±2)°С; 8 сут) и размораживания (24 ч; (4±2)°С) - «Р»

(размороженное) по аналогии с нативным. Далее представлены типовые результаты исследований, максимально объективно демонстрирующие выявленные характеристические особенности систем. Следует отметить, что на данном этапе исследований не стояло задачи по определению закономерностей. Работа была ориентирована на выявление значимых изменений в свойствах сырья, способных так или иначе отразиться на результатах последующего анализа.

Для всех объектов исследования при анализе технологических свойств осуществляли контроль титруемой и активной кислотности (pH) как в нативном виде, так и после дефростации (рисунок 4).

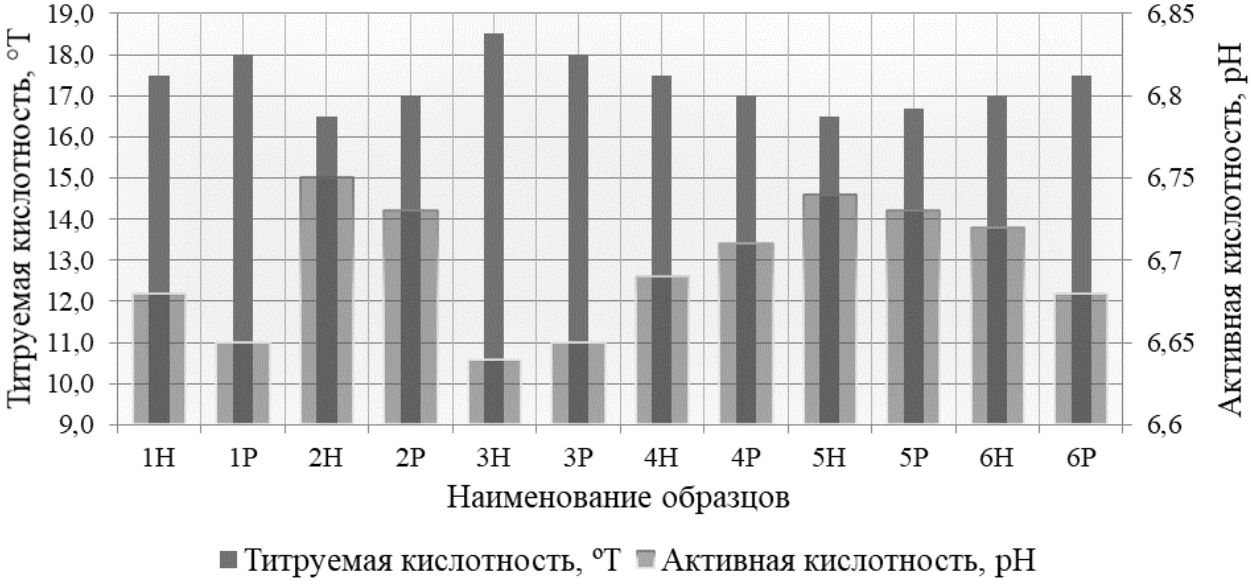


Рисунок 4 – Показатели титруемой и активной кислотности образцов сырого обезжиренного молока до и после дефростирования

Как видно из рисунка 4 относительные изменения титруемой и активной кислотности во всех экспериментальных образцах находились в пределах погрешности методов измерений.

ТУ образцов определяли с применением АП и ТП (рисунок 5).

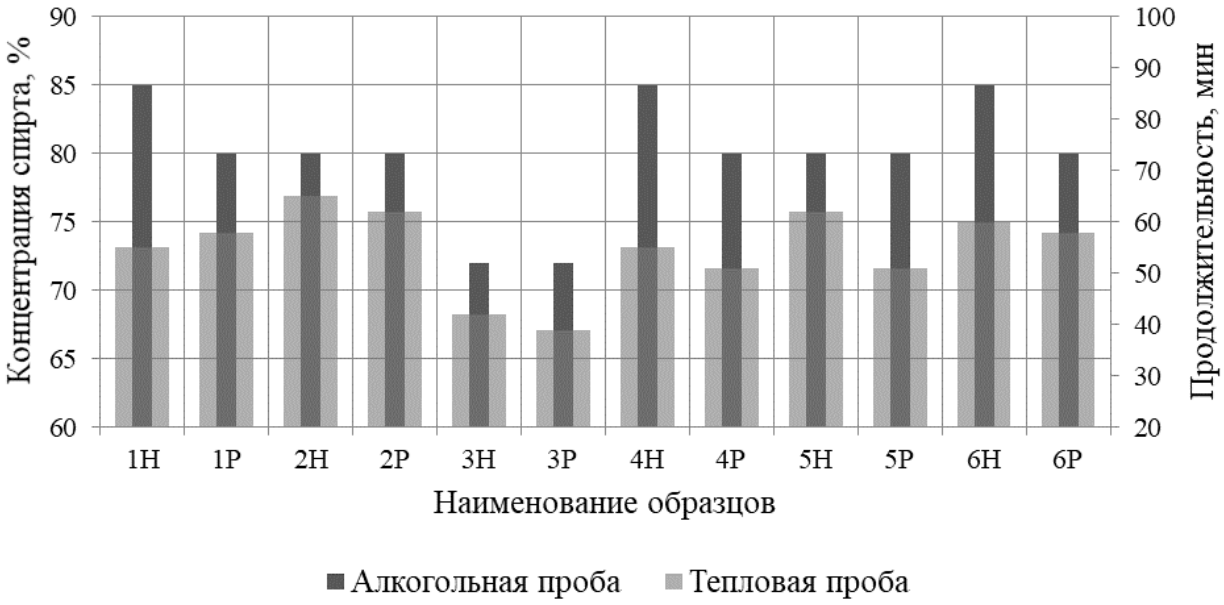


Рисунок 5 – Результаты определения ТУ объектов исследования

АП по модифицированной во ВНИМИ методике (дополнительно используются концентрации этанола 85%, 90% и 95%) показала отсутствие изменений в образцах 2Н/2Р, 3Н/3Р и 5Н/5Р и снижение показателей на одну группу в образцах 1Н/1Р, 4Н/4Р и 6Н/6Р в расширенной области концентраций.

ТП при температуре (130±1)°С выявила незначительное снижение ТУ во всех объектах исследования, за исключением образцов 1Н/1Р, где была отмечена тенденция к увеличению.

Самые низкие значения ТУ по обеим пробам отмечены в образцах 3Н/3Р, что обоснованно коррелирует с уровнями титруемой и активной кислотности в них. В остальных образцах не выявлено закономерностей изменения ТУ.

Оценка ССС экспериментальных образцов (рисунок 6) показала, что замораживание и дефростирование не повлияло на продолжительность коагуляции или способствовало ее снижению. При этом во всех образцах было отмечено увеличение количества протеиновых фракций в сыворотке на (3÷10)% при сохранении массовой доли общего белка, что может говорить о возможном нарушении структуры мицелл казеина и переходе в сыворотку части казеиновых фракций.

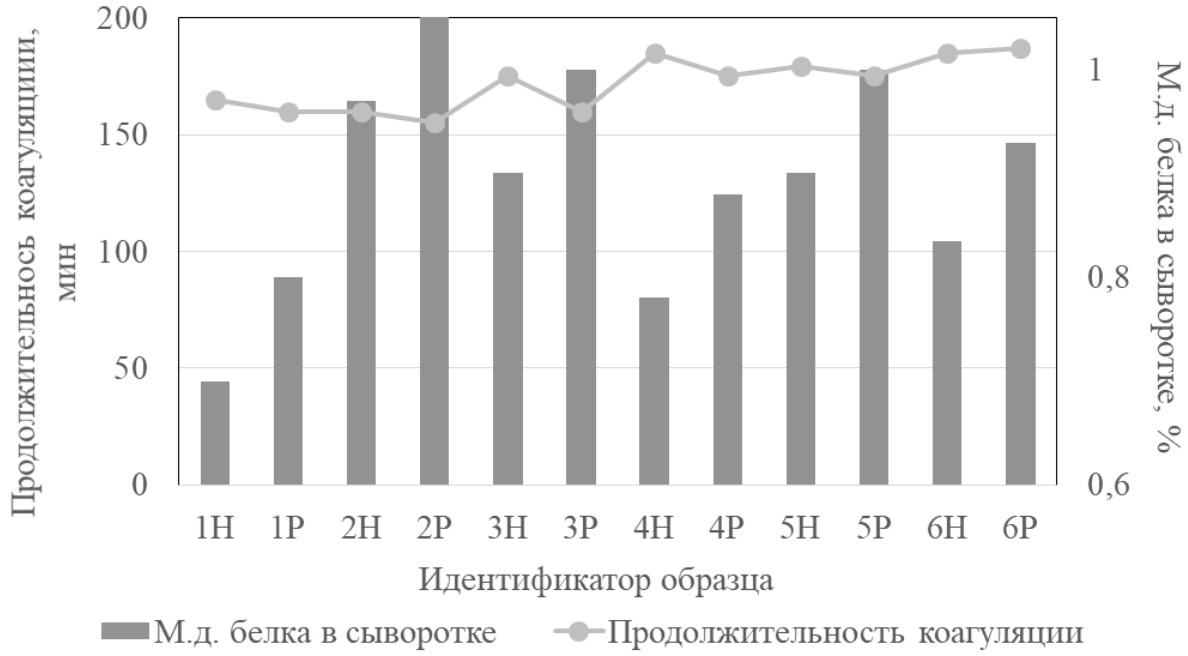


Рисунок 6 – Результаты оценки ССС объектов исследования

В целом, по результатам этапа установлено, что по совокупности параметров в молоке-сырье после кратковременного замораживания и последующей дефростации сохраняются основные характеристики, отображающие комплексный результат оценки технологических свойств в исследуемых пробах. Все отмеченные изменения анализируемых показателей имели допустимые значения и, по большей части, находились в пределах погрешностей использованных методов измерений. При этом, указанные результаты получены на молоке отдельно взятых животных при значимой выборке n>80 особей. На основании проведенных исследований метод криоконсервирования был интегрирован в технологию транспортировки и сублимационной сушки образцов молока, отобранных для молекулярно-генетических исследований.

3.2 Исследование ассоциации полиморфизма гена *CSN3* крупного рогатого скота с технологическими свойствами сухого молока

Глобальные тенденции в производстве пищевых продуктов предполагают увеличение объемов переработки СМ. Этот вид сырья по праву считается наиболее востребованным и универсальным, поскольку находит широкое применение в производстве не только молочных продуктов, но и хлебобулочных, кондитерских,

мясных и др. При этом СМП фактически являются ангидрированным сборным сырьем со специфическими функционально-технологическими показателями.

Соответственно в работе исследовано влияние высушивания молока во взаимосвязи с генотипом лактирующих животных по гену *CSN3* и его технологическими свойствами. Объектами исследования являлись образцы молока в нативном и высушенном состоянии, а также реальные и модельные восстановленные системы СМ распылительной (РС) и сублимационной (СС) сушки.

Первоначально отбирали молоко от коров с генотипами *AA*, *AB* и *BB* по гену *CSN3*, которое в течение 3-5 часов после дойки замораживалось (до минус 18°С) и транспортировалось во ФГАНУ «ВНИМИ». Образцы после дефростации подвергались СС на производственном участке с использованием аппаратов камерного типа модели TG-50 («Hochvakuum», Германия) в лотках вместимостью 1 дм^3 при следующих температурных режимах: минус (35±5)°С в начале процесса; плюс (30±5)°С в конце процесса. Продолжительность процесса составила (42±2) часа при остаточном давлении от 0,3 кПа до 1,3 кПа.

Полученные образцы СМ предварительно исследовали с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа (рисунок 7) для подтверждения генотипа по гену *CSN3*.

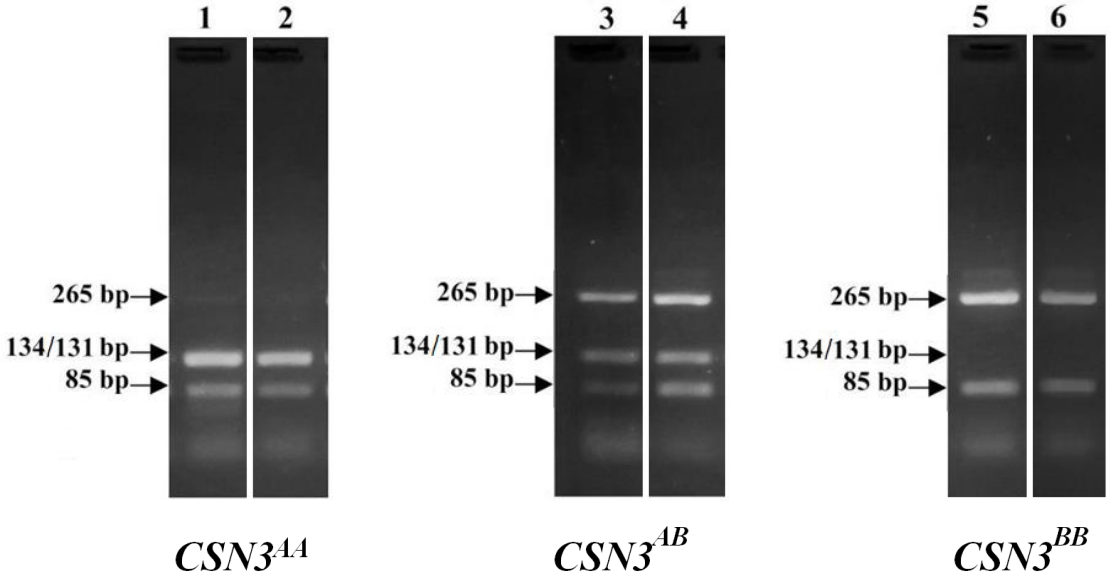


Рисунок 7 – ПЦР-ПДРФ анализ образцов сырого и СМ

(Образцы № 1,3,5 – сырое молоко; № 2,4,6 – сублимированное молоко)

В результате данного эксперимента выявлена сходимость результатов идентификации образцов сырого молока и молока, подвергнутого СС, независимо от аллельного варианта гена *CSN3*.

В рамках оценки влияния полиморфизма гена *CSN3* на качественные характеристики белковой фазы молока, были проведены исследования аминокислотного состава образцов молока, полученных от коров с генотипами *AA* и *BB*, в соответствии с общепринятыми методиками [33, 35].

Сравнительный анализ содержания незаменимых аминокислот (НАК) в образцах молока от коров с генотипами *AA* и *BB* (образцы АА и ВВ соответственно) выявил практически схожие показатели по валину, изолейцину, лейцину, треонину, триптофану, фенилаланину и тирозину. Молоко АА характеризовалось большим содержанием лизина (5,09 г/100 г белка) и меньшим содержанием суммы аминокислот метионина и цистина (2,81 г/100 г белка) по сравнению с молоком ВВ. Оценка аминокислотного индекса (АИ), характеризующегося отношением незаменимых аминокислот к заменимым аминокислотам, показала, что полученные значения в молоке ВВ (0,65) соответствуют рекомендуемым ФАО/ВОЗ значениям по сбалансированному питанию (0,56–0,67). Аминокислотный индекс молока с генотипом АА (0,78) превышает рекомендуемые ФАО/ВОЗ показатели, что свидетельствует о незначительном дисбалансе в сторону содержания НАК и как следствие может приводить к замедлению их метаболической доступности.

Полученные результаты позволили определить полноценность молочного белка в образцах АА и ВВ (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка сбалансированности аминокислотного состава цельного молока, полученного от коров с разными генотипами по гену *CSN3*

Наименование образца	Коэффициент утилитарности	Избыточность незаменимых аминокислот, г/100 г белка	Сопоставимая избыточность, г/100 г белка	Индекс незаменимых аминокислот (ИНАК)
АА	0,79	6,28	9,98	0,87
ВВ	0,78	6,39	10,13	0,87

Рассчитанные коэффициенты утилитарности, характеризующиеся общим количеством НАК, которое может быть подвергнуто утилизации организмом человека, находились практически на одинаковом уровне (0,79 – *АА*; 0,78 – *ВВ*). Количество незаменимых аминокислот, гипотетически не пошедших на анаболические нужды организма для молока АА, составило 6,28 г/100 г белка, а для молока ВВ – 6,39 г/100 г белка. Показатель сопоставимой избыточности, учитывающий лимитирующую аминокислоту для образа АА, находился на уровне 9,98 г/100 г белка, для образца ВВ – 10,13 г/100 г белка. Таким образом, описанные различия в аминокислотном составе, не оказали значимого влияния на биологическую ценность молочных белков, в том числе и в сравнительном аспекте образцов АА и ВВ.

Для дальнейших исследований ТУ и ССС отобрана выборка образцов молока, данные по которой представлены в таблице 8. Молоко СС, промаркированное как $АА^1$ и $ВВ^1$, соответственно, восстанавливали до массовой доли сухих веществ исходного сырья. Также из СМ образов группы $ВВ^1$ составляли опытные образцы $ВВ^2$ с массовой долей белка, приближенные к аналогичному показателю образцов группы $АА^1$.

Таблица 8 – Физико-химический состав образцов ВМ

Наименование показателя	Восстановленное молоко		
	$АА^1$	$ВВ^1$	$ВВ^2$
Массовая доля жира, %	3,65±0,15	3,77±0,18	3,66±0,17
Массовая доля общего белка, %	3,04±0,07	3,21±0,09	3,11±0,08
Массовая доля сывороточных белков, %	0,83±0,08	0,80±0,09	0,76±0,007
Массовая доля казеиновых белков, %	2,21±0,05	2,41±0,04	2,31±0,06
Массовая доля влаги, %	88,21±0,8	87,94±0,8	86,1±0,9
Массовая доля СОМО, %	8,14±0,07	8,29±0,04	8,01±0,05
Массовая доля 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, ±0,05	6,74	6,67	6,65

Оценка физико-химических показателей сухих и восстановленных образцов молока от коров с генотипами *AA* и *BB* по гену *CSN3* показала существенные различия как в качественном, так и количественном отношении. Молоко, полученное от коров с генотипом *BB* по гену *CSN3*, характеризовалось более высокой массовой долей жира, белка и сухих веществ в целом. Несмотря на различия в массовой доле белка между образцами AA^1 и BB^1, отношение казеинов к сывороточным белкам находилось стабильно ориентировочно на уровне 75:25.

Результаты изучения ТУ образцов ВМ, с применением 5 наиболее распространенных методик исследования, представленные в таблице 9, показали частичную корреляцию.

Таблица 9 – Исследование ТУ ВМ из СМ СС, полученного от коров с разными генотипами по гену *CSN3*

Наименование образца	pH (±0,05)					
	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0
	Алкогольная 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%
	Хлоркальциевая 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.

«–» отрицательный результат (наличие хлопьев); «+» положительный результат (отсутствие хлопьев)

Наиболее информативными в работе оказались АП и ТП, выявившие существенные различия между образцами AA^1 и BB^2. Установлено, что ТУ молока

коров, несущих *A*-аллель гена *CSN3* в диапазоне pH 6,6 – 7,0, была выше, чем у молока коров, несущих *B*-аллель.

Далее проведены эксперименты по определению ССС образцов AA^1 и BB^2. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Исследование ССС ВМ из СМ СС

Наименование показателя	MICROCLERICI		CHY-MAX	
	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±0,04	0,96±0,05	0,73±0,04
Переход общего белка в сыворотку, %, не более	35	27	33	24

Анализ данных таблицы 10 выявил зависимость в скорости образования сгустка, где молоко коров, несущих *B*-аллель гена *CSN3*, преобладало над молоком коров, несущих *A*-аллель. Кроме того, схожая зависимость наблюдалась и при оценке качества полученного сгустка, а также оценке степени потери белка, связанного с переходом его в сыворотку. Стоит отметить, что наилучшими молокосвертывающими характеристиками обладал ферментный препарат CHY-MAX, независимо от генотипической принадлежности молока.

Так как в ходе исследований отмечен ряд аномальных значений, для более глубокой проработки методики модифицирован процесс пробоподготовки образцов. В частности, для снижения ряда количественных факторов (м. д. жира, механических примесей и т.д.), непосредственно влияющих на ТУ и ССС молочного сырья [29, 74], решено использовать процесс сепарирования.

В таблице 11 представлен усредненный физико-химический состав обезжиренного сырого молока. Образцы маркированы следующим образом: AA^0 – сырое молоко животных с генотипом *AA*, AB^0 – *AB*, BB^0 – *BB* соответственно.

Таблица 11 – Состав образцов сырого обезжиренного молока перед сушкой

Наименование показателя	Фактические значения		
	Образец AA^0	Образец AB^0	Образец BB^0
Массовая доля жира, %	0,06±0,006	0,05±0,004	0,06±0,005
Массовая доля общего белка, %	2,82±0,11	3,05±0,13	3,38±0,15
Массовая доля сывороточных белков, %	0,77±0,03	0,78±0,04	0,81±0,03
Массовая доля казеиновых белков, %	2,04±0,1	2,18±0,09	2,60±0,11
Массовая доля сухих веществ, %	8,16±0,33	8,66±0,36	9,10±0,41
Массовая доля 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, ±0,05	6,77	6,83	6,73

Анализ физико-химических показателей обезжиренного молока, полученного от коров с полиморфными генотипами по гену *CSN3*, показал нивелирование фактора массовой доли жира в процессе пробоподготовки. Различия массовой доли белка между образцами AA^0 и AB^0 незначимо (2,82% и 3,05% соответственно) в отличии от образца BB^0, где массовая доля белка находилась на уровне 3,38%. Рассматривая фракционный состав белков, следует отметить неизменную тенденцию в сохранении соотношения сывороточных и казеиновых фракций белков на уровне 27:73%. Соотношение данных фракций в образце AB^0 составляло 23:77%. Образец AB^0 в дальнейших исследованиях рассматривался как контроль.

Образцы нативного молока подвергались распылительной (AA^1, AB^1, BB^1) и сублимационной сушке (AA^2, AB^2, BB^2). 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 8.

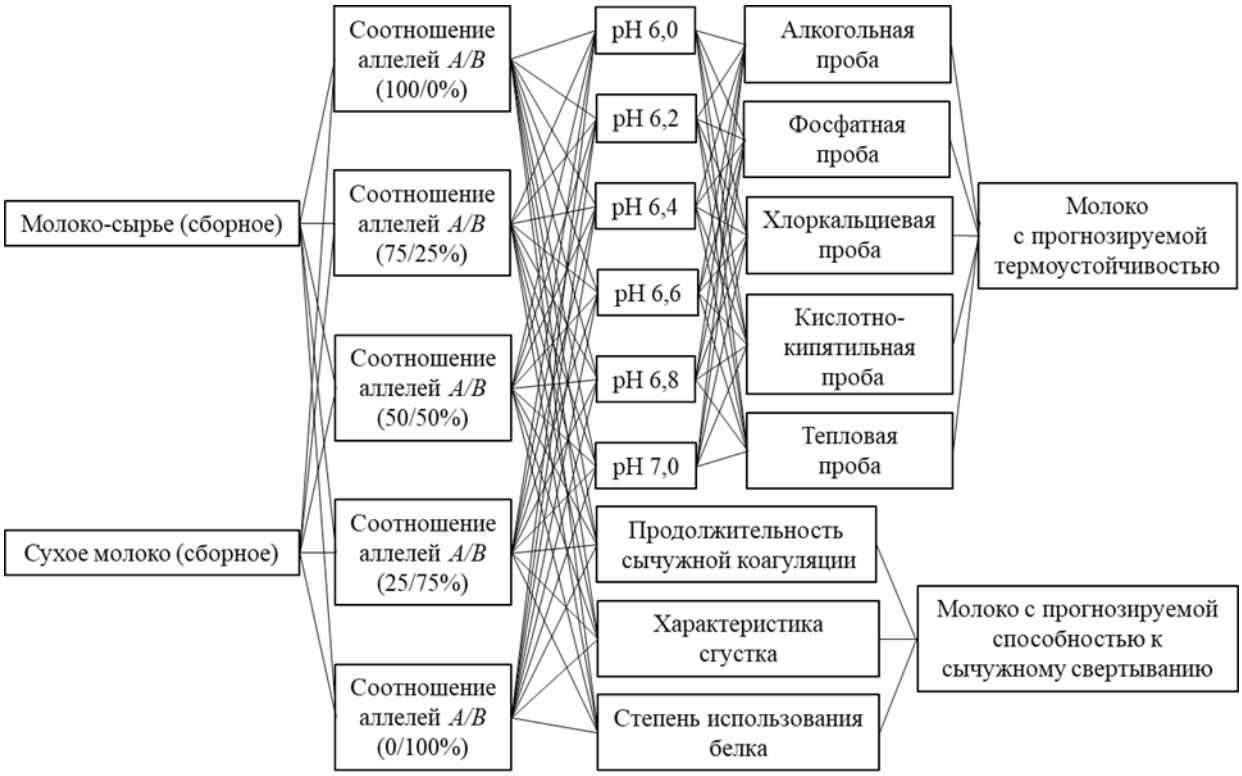


Рисунок 8 – Принципиальная схема моделирования экспериментальных образцов

В данной линейке опытов из пяти ранее использованных методик определения ТУ применяли три: АП, ТП и ККП, наиболее полно описывающие анализируемую область свойств. В таблице 12 приведены результаты исследований по ТУ ВМ методом АП.

Таблица 12 – Исследование ТУ ВМ методом АП

Наименование образца	pH					
	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0
AA^1: BB^1 (100:0%)	< 68 %			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 %	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%

Анализ изложенных в таблице 12 результатов показал, что снижение активной кислотности ниже pH 6,6 приводит к снижению ТУ (ниже 5 группы по алкогольной пробе) и видимой денатурации белка при добавлении 68 % спиртового раствора во всех без исключения образцах молока. Повышение уровня активной кислотности приводило к закономерному увеличению ТУ молока, при этом наблюдалась тенденция к повышению ТУ молока с повышением в модельных системах содержания молока коров с гомозиготным генотипом *AA* гена *CSN3*. Представленные в таблице 12 результаты исследования образцов ВМ из СМ СС и РС показали хорошую сходимость.

Проведен анализ ТУ ВМ методом ККП (таблица 13).

Таблица 13 – Исследование ТУ ВМ методом ККП

Наименование образца	pH		
	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*

«–» - отрицательный результат; *кол-во 0,1н HCl, которое выдержало молоко, мл

Анализ образцов по ККП выявил отсутствие ТУ всех образцов при значении pH ниже 6,6. В диапазоне pH 6,6 … 7,0 установлены незначительные отличия между молоком всей модельной линейки по гену *CSN3*, подвергнутым РС и СС, что отчетливо прослеживается при значении выше pH 6,6 (таблица 13). Образец AA^1: BB^1 (100:0%) выдержал внесение 0,5 мл и 0,6 мл 0,1н HCl и остался стабильным к тепловой обработке при значениях активной кислотности 6,6 и 6,8 соответственно, а также 0,8 мл 0,1н HCl при pH 7,0. Также при внесении 0,5 мл 0,1н HCl сохранил свою коллоидную стойкость образец AA^1: BB^1 (75:25%). Образцы

модельных систем молока СС показали схожие результаты. Контрольные образцы в пределах характерных значений pH выдержали внесение 0,5 мл 0,1н HCl.

Дальнейшей стадией исследований являлось изучение ТУ ВМ методом ТП, как методики, наиболее полно учитывающей все факторы, влияющие на стабильность белка при оценке ТУ молока. Результаты исследований представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Исследование ТУ ВМ методом ТП (± 1 мин. при τ≥15 мин.; ± 0,5 мин. при τ≤15 мин.)

Наименование образца	pH					
	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0
AA^1: BB^1 (100:0%)	≤ 0,5 мин	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 мин	9 мин	35 мин	45 мин	53 мин
AA^2: BB^2 (100:0%)		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

Результаты исследований, представленные в таблице 14, показали, что образцы молока РС и СС имеют схожие зависимости изменения ТУ как в градиенте pH, так и с повышением в модельных системах содержания молока коров с гомозиготным генотипом *AA* по гену *CSN3*.

Так все смоделированные образцы не выдерживали температурного воздействия при pH 6,0 и 6,2. При повышении pH до 6,4 дестабилизации

подверглись только образцы со 100% содержанием молока коров с гомозиготным генотипом *BB* по гену *CSN3* и контрольные образцы, подвергнутые процессу РС и СС. Все остальные образцы выдерживали высокотемпературную обработку достаточную для производства большинства видов молочной продукции, однако наиболее термоустойчивым следует считать сборное сухое молоко с преобладанием молока, полученного от коров с генотипом *AA* по гену *CSN3* (от 75% до 100%). Обобщая проведенные исследования, стоит отметить, что результаты кислотно-кипятильной пробы не сопоставляются с результатами алкогольной и тепловой проб, которые являются более информативными и, в большинстве случаев, коррелируют между собой.

На следующем этапе исследований проводились эксперименты по определению ССС модельных систем молока. Способность молочного сырья, в том числе и СМ после его восстановления, к образованию плотного сгустка под действием молокосвертывающих ферментов следует рассматривать, как наиболее важный фактор при производстве сыра и творога.

На данном этапе работы учтены результаты предварительных исследований и массив последующих экспериментов осуществлен с ферментным препаратом CHY-MAX на модельных системах ВМ СС и РС – таблица 15.

Таблица 15 – 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±0,04	25,35±0,24
AA^1: BB^1 (75:25%)	203±4	II	0,827±0,06	28,72±0,32
AA^1: BB^1 (50:50%)	185±3	II	0,893±0,06	30,58±0,41
AA^1: BB^1 (25:75%)	180±3	I	0,951±0,07	31,81±0,38
AA^1: BB^1 (0:100%)	160±3	I	0,995±0,07	32,62±0,36
AB^1 (контроль)	110±2	II	1,005±0,08	29,73±0,27
AA^2: BB^2 (100:0%)	205±4	I	0,651±0,03	23,09±0,22
AA^2: BB^2 (75:25%)	180±4	I	0,765±0,04	26,56±0,31
AA^2: BB^2 (50:50%)	270±4	I	0,846±0,05	28,97±0,33
AA^2: BB^2 (25:75%)	180±2	I	0,925±0,06	30,94±0,42
AA^2: BB^2 (0:100%)	165±3	I	0,996±0,06	32,66±0,34
AB^2 (контроль)	210±4	I	1,003±0,08	29,67±0,04

Анализ экспериментальных данных показал, 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 их коагуляции составила от 160 до 180 минут, тогда как максимальное время коагуляции для молока СС составило 270 минут, а для молока РС – 225 минут.

При этом наблюдаются различия в качестве сгустка при РС и СС. Так в случае СС сгустки всех модельных образцов относятся к I категории, в то время как при РС к данной категории относятся только образцы AA1: BB1 (25:75%), AA1: BB1 (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. Молоко с маленьким размером мицелл казеина образует сгусток с более высокой плотностью и твердостью, чем молоко с крупным размером мицелл. Однако более высокое содержание небольших мицелл по всей видимости априори способствует увеличению потерь при отделении сыворотки от сырного зерна.

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

Полученные в результате проведенных исследований данные позволили интегрировать их в молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки свойств СМ, что будет способствовать повышению рациональности процессов переработки.

3.3 Молекулярно-генетическая и биоинформационная система оценки технологических свойств в сборном молоке-сырье и сухом молоке

На базе проведенных исследований разработана молекулярно-генетическая и биоинформационная система оценки технологических свойств перерабатываемого сырья, основанная на определении в сборном молоке-сырье и СМ соотношения

относительных долей аллелей гена *CSN3* КРС. Методологический подход включает в себя экстракцию ДНК из исследуемых образцов, проведение совмещенной техники полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), учет результатов амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот методом электрофореза и анализ информационных данных, в т.ч. интерпретируемых с помощью разработанных математических алгоритмов и созданного программного обеспечения.

В рамках опытов экстракцию ДНК из исследуемых образцов проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) согласно инструкции производителя.

При этом пробирки с образцами сборного сырого молока предварительно подвергали центрифугированию с частотой вращения 12 000 об/мин в течение 15 мин. Затем из каждой пробирки удаляли надосадочную жидкость, используя отдельные наконечники на 200 мкл (без фильтра) и применяя аспиратор с колбой ловушкой («FTA-1», Biosan, Латвия). Далее следовали инструкции ЦНИИ Эпидемиологии, Россия [42].

Полученную по завершению всех этапов выделения надосадочную жидкость использовали в качестве пробы ДНК для постановки ПЦР.

Исходные и рабочие концентрации реагентов, очередность их внесения и объемы для приготовления реакционных смесей, нуклеотидная последовательность праймеров, режим термоциклирования и инкубирования, а также размеры генерируемых ПЦР-продукта и ПЦР-ПДРФ-фрагментов представлены в разделе 2.1.6.

Детекцию результатов амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот проводили с помощью горизонтального электрофореза. Для этого готовили рабочий 1× ТАЕ буфер из концентрированного 50-ти кратного трис-ацетатного электродного буфера (ЗАО «Синтол», Россия), в который вносили 15 мкл 1% раствора этидиума бромида и 2 % гель из агарозы (Biotechology Grade, Amresco, США). Готовый гель помещали в камеру для горизонтального

электрофореза («SE-2», Хеликон, Россия), куда затем заливали готовый электродный буфер выше уровня геля на 5 мм.

Из пробирок с продуктами амплификации отбирали по 10 мкл ПЦР-пробы, которые окрашивали 2 мкл буфера для нанесения (10× SE-буфер для нанесения с красителем, ООО «СибЭнзим», Россия).

В качестве источника питания для проведения электрофореза использовали прибор «Эльф-4» (ДНК-Технология, Россия) в следующем режиме: выходное напряжение – 150 В, выходной ток – 150 мА, выходная мощность – 50 Вт. Время электрофореза – 30 мин.

По окончанию электрофореза гель переносили на трансиллюминатор системы гель-документирования «Gel Doc XR+» с поддержкой программного обеспечения («Image Lab» Bio-Rad, США). Изображение геля получали на компьютере с помощью видеосистемы с последующим его анализом и документированием.

Программа позволяла рассчитывать значение абсолютной величины (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта длиной 350 bp (band) каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности. Для этого в настройках программы задавались значение контрольной (эталонной) ПЦР-пробе* первой повторности, равное 100, устанавливалась единица измерения – none, линейная регрессия – Linear. Полученные программно данные использовали для расчета отбираемого объема ПДРФ-пробы для внесения в лунки агарозного геля по формуле:

$$U = \frac{100 \times A}{Q} \qquad (3)$$

где U – отбираемый объем ПДРФ-пробы для внесения в лунки агарозного геля за исключением контрольной ПДРФ-пробы первой повторности, мкл; 100 – значение абсолютной величины (Quantity) контрольной ПЦР-пробы первой повторности; А – отбираемый объем контрольной ПДРФ-пробы первой повторности для внесения в лунки агарозного геля, мкл, (в работе использовано значение 20); Q – значение абсолютной величины (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта анализируемой

контрольной ПЦР-пробы второй повторности, а также последующих ПЦР-проб в двойных повторностях, рассчитанных программно.

Рассчитанные объемы ПДРФ-проб отбирали из пробирок с продуктами эндонуклеазного расщепления и окрашивали введением 2 мкл буфера для нанесения в чистых пробирках, после чего их вносили в гель для проведения второго электрофореза в режиме: выходное напряжение – 150 В, выходной ток – 150 мА, выходная мощность – 50 Вт. Время электрофореза – 40 мин.

Как и при первом электрофорезе, гель анализировали на компьютере с помощью видеосистемы и последующим документированием результата.

Для анализа каждой ПДРФ-пробы в двойной повторности программно рассчитывали значения абсолютной величины(Quantity) детектируемых ПДРФ-фрагментов с длинами 134/131 bp (band 2), занимающих среднее положение между верхним ПДРФ-фрагментом размером 265 bp (band 1) и нижним ПДРФ-фрагментом размером 85 bp (band 3), для чего задавали значение Quantity, равное 100 для band 1 (265 bp) каждой пробы, выбрав единицу измерения – none, выставив линейную регрессию – Linear. Полученные в ходе анализа данные использовали в дальнейших расчетах для определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*.

Рассчитывали числовой показатель контрольной ПДРФ-пробы* первой и второй повторности (с последующим выведением среднеарифметического значения) по формуле:

$$\text{ЧП} = \frac{Q1}{Q2} \qquad (4)$$

где ЧП – числовой показатель; $Q1$ – значение абсолютной величины (Quantity) детектируемого ПДРФ-фрагмента размером 265 bp (band 1), равное 100; $Q2$ – значение абсолютной величины (Quantity) детектируемого ПДРФ-фрагмента размером 134/131 bp (band 2).

Выстраивали процентную шкалу соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* (прописывая долю аллеля *A* в процентном выражении, оставшаяся часть которого приходилась на долю аллеля *B*) с расчетом соответствующего значения

шкалы числового показателя (шЧП). Для расчета шЧП предварительно определяли ожидаемое значение Quantity для band 1 (оQ1) и band 2 (оQ2) по формулам:

$$oQ1 = \frac{B\% \times \text{н}Q1}{\text{к}B\%} \quad (5)$$

где оQ1 – ожидаемое значение Quantity для band 1; B% –доля аллеля B в процентном выражении выстраиваемой шкалы; нQ1 – наблюдаемое значение Quantity для band 1 контрольной ПДРФ-пробы, равное 100; кB % – доля аллеля B контрольной ПДРФ-пробы, %.

$$oQ2 = \frac{A\% \times \text{н}Q2}{\text{к}A\%} \quad (6)$$

где оQ2 – ожидаемое значение Quantity для band 2; A% – доля аллеля A в процентном выражении выстраиваемой шкалы; нQ2 – наблюдаемое среднеарифметическое значение Quantity для band 2 контрольной ПДРФ-пробы; кA% – доля аллеля A контрольной ПДРФ-пробы, %.

Оперируя полученными значениями, рассчитывали числовой показатель для выстроенной процентной шкалы соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* по формуле:

$$\text{шЧП} = \frac{oQ1}{oQ2} \quad (7)$$

где шЧП – числовой показатель для выстроенной процентной шкалы соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*; оQ1 – ожидаемое значение Quantity для band 1; оQ2 – ожидаемое значение Quantity для band 2.

Рассчитывали для каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности ЧП согласно формуле (4) с последующим выведением среднеарифметического значения.

Полученные ЧП сопоставляли с соответствующими шЧП для выстроенной процентной шкалы соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*, прописывая установленную долю аллеля A в процентном выражении с указанием абсолютной (± Δ, %). и относительной погрешности (± σ, %).

Контрольные (эталонные) ПЦР- и ПДРФ-пробы формировались из числа образцов сборного СМ, сборного сырого молока с известным соотношением

относительных долей аллелей гена *CSN3* КРС, прошедших этапы пробоподготовки, экстракции, амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот. В качестве контрольного (эталонного) образца также может использоваться препарат ДНК, выделенный из коровьего молока с генотипом *AB* гена *CSN3* с относительной долей аллеля *A*, равной 50%.

На рисунках 9-14 и в таблицах 16–21 приведены примеры определения в сборном молоке-сырье соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* крупного рогатого скота, в каждом из которых анализировали 1 контрольный и 3 опытных образца СМ в двух повторностях ввиду применения 8-луночного агарозного геля. В 1-м примере в качестве контрольного образца использовали молоко коров с генотипом *AB* гена *CSN3* с относительной долей аллеля *A*, равной 50%, а в качестве опытных - два образца сухого обезжиренного молока (СОМ 1 и СОМ 2), и один образец сухого цельного молока (СЦМ 1).

На рисунке 9 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта длиной 350 bp (band) каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности для примера 1.

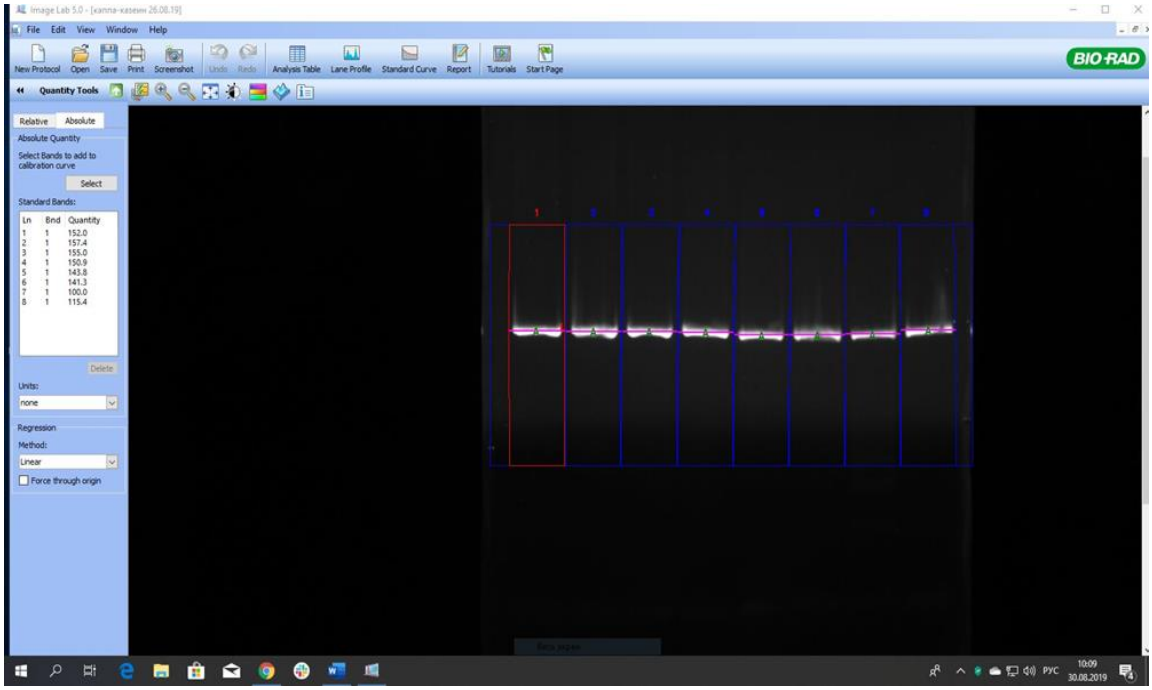


Рисунок 9 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПЦР-проб примера 1

В таблице 16 представлены полученные значения Quantity и рассчитанные объемы ПДРФ-проб, отбираемые для внесения в лунки второго агарозного геля.

Таблица 16 – Значения Quantity анализируемых ПЦР-проб и отбираемые объемы ПДРФ-проб примера 1

№ образца	ПЦР-проба образца сухого молока	Quantity	Отбираемый объем ПДРФ-пробы, мкл
1	СОМ 1 первой повторности	152,0	13,1
2	СОМ 1 второй повторности	157,4	12,7
3	СОМ 2 первой повторности	155,0	12,9
4	СОМ 2 второй повторности	150,9	13,2
5	СЦМ 1 первой повторности	143,8	13,9
6	СЦМ 1 второй повторности	141,3	14,1
7	Контрольная ПЦР-проба первой повторности (генотип *AB CSN3*)	100,0	20
8	Контрольная ПЦР-проба второй повторности (генотип *AB CSN3*)	115,4	17,3

На рисунке 10 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity 1 и Quantity 2) детектируемых ПДРФ-фрагментов каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности для примера 1.

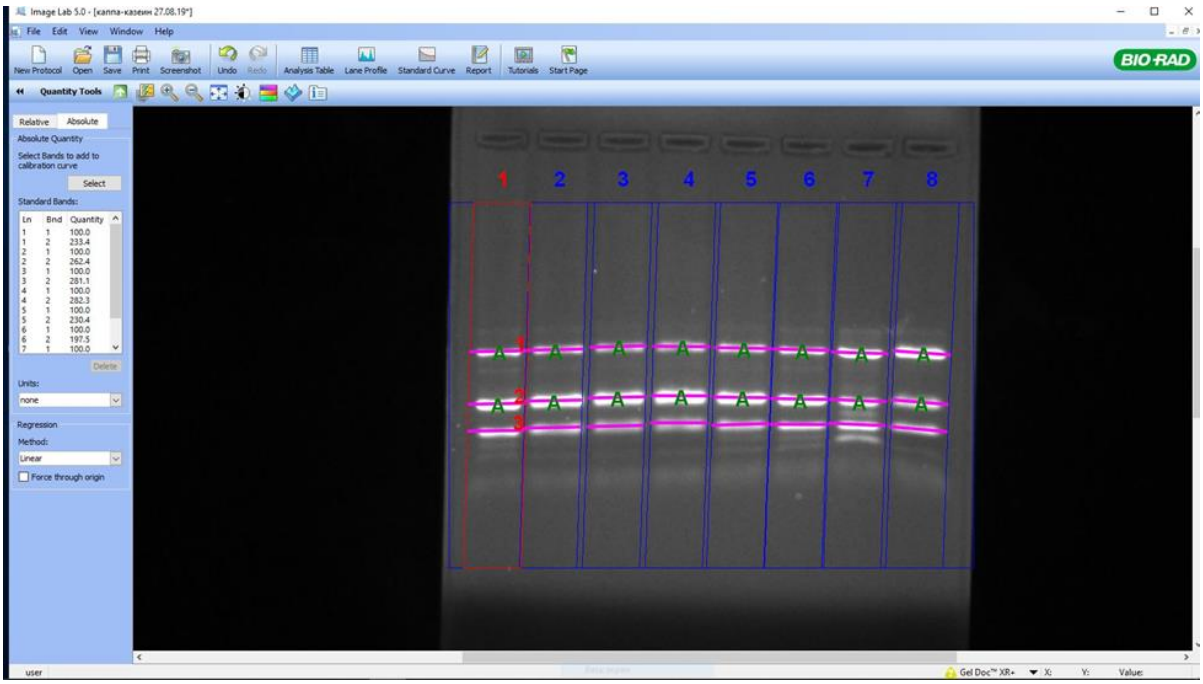


Рисунок 10 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПДРФ-проб примера 1

А в таблице 17 приведены данные дальнейшей математической обработки полученных в первом подходе величин. Таблица включает как экспериментальные, так и рассчитанные ожидаемые показатели, сопоставление которых необходимо для выведения конечного результата.

Таблица 17 – Пример 1 расчета относительных долей аллеля *A* в образцах исследуемого СМ

№ лунки	ПДРФ-проба образца сухого молока	Экспериментальные данные			Шкала (доля аллеля А, %)	Теоретические данные по построенной шкале		
		Quantity 1	Quantity 2	ЧП		oQuantity 1	oQuantity 2	шЧП
1	СОМ 1 первой повт.	100,0	233,4	0,43	79	42	82,08	0,51
2	СОМ 1 второй повт.	100,0	262,4	0,38	80	40	83,12	0,48
Среднеарифметическое значение для лунок 1,2		100,0	247,9	0,40	80,5			0,47
3	СОМ 2 первой повт.	100,0	281,1	0,36	81	38	84,16	0,45
4	СОМ 2 второй повт.	100,0	282,3	0,35	81,5			0,44
Среднеарифметическое значение для лунок 3,4		100,0	281,7	0,35	82	36	85,2	0,42
5	СЦМ 1 первой повт.	100,0	230,4	0,43	82,5			0,4
6	СЦМ 1 второй повт.	100,0	197,5	0,51	83	34	86,24	0,39
Среднеарифметическое значение для лунок 5,6		100,0	213,95	0,47	83,5			0,38
7	Контрольная первой повт. (генотип *AB CSN3*)	100,0	54,4	1,84	84	32	87,28	0,37
8	Контрольная второй повт. (генотип *AB CSN3*)	100,0	49,5	2,02	84,5			0,35
Среднеарифметическое значение для лунок 7,8		100,0	51,95	1,92	85	30	88,31	0,34

Как видно из таблицы 17, по итогам соотнесения экспериментально полученного ЧП с шкальным шЧП было установлено, что относительная доля аллеля А в образце СОМ 1 составила 82,5% (Δ ± 1%; σ ± 1,2%), в образце СОМ 2 – 84,4% (Δ ± 0,1%; σ ± 0,1%), в образце СЦМ 1 – 80,25% (Δ ± 1,25%; σ ± 1,55%).

Во втором примере в качестве контрольного образца использовали уже СЦМ с известной относительной долей аллеля А, равной 80,25%, а в качестве опытных образцов: СОМ 3, СОМ 4, СОМ 5.

На рисунке 11 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности для примера 2.

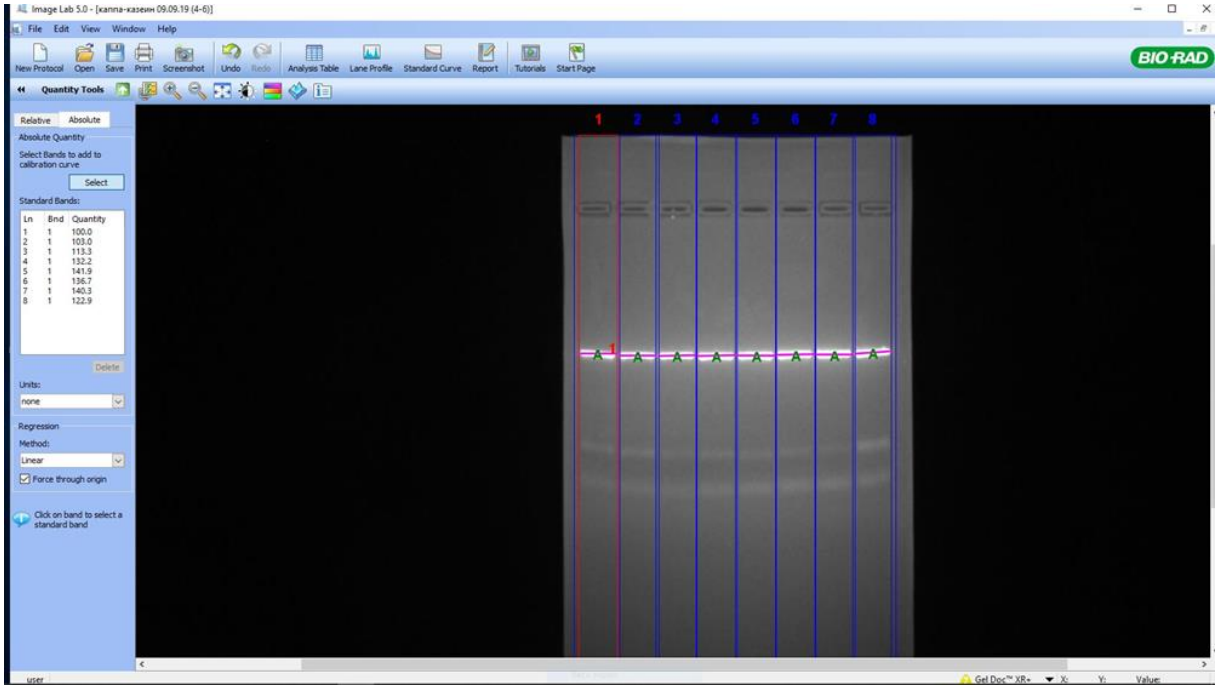


Рисунок 11 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПЦР-проб примера 2

В таблице 18 представлены полученные значения Quantity и рассчитанные объемы ПДРФ-проб, отбираемые для внесения в лунки второго агарозного геля в примере 2.

Таблица 18 – Значения Quantity анализируемых ПЦР-проб и отбираемые объемы ПДРФ-проб примера 2

№ п.п.	ПЦР-проба образца сухого молока	Quantity	Отбираемый объем ПДРФ-пробы, мкл
1	СЦМ 1 (контроль) первой повторности	100	20
2	СЦМ 1 (контроль) второй повторности	103	19,4
3	СОМ 3 первой повторности	113,3	17,6
4	СОМ 3 второй повторности	132,2	15,1
5	СОМ 4 первой повторности	141,9	14,1
6	СОМ 4 второй повторности	136,7	14,6
7	СОМ 5 первой повторности	140,3	14,2
8	СОМ 5 второй повторности	122,9	16,3

На рисунке 12 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity 1 и Quantity 2) детектируемых ПДРФ-фрагментов каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности для примера 2.

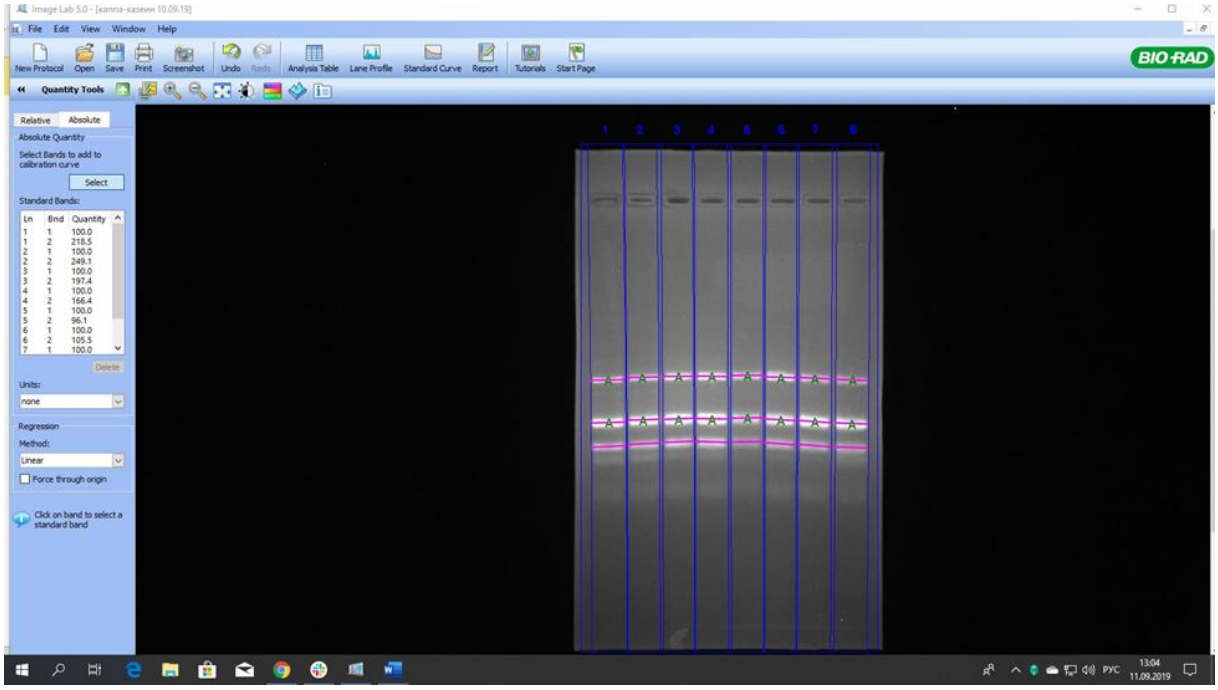


Рисунок 12 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПДРФ-проб примера 2

Полученные в примере 2 результаты с рассчитанными показателями сведены в таблицу 19.

Таблица 19 – Пример 2 расчета относительных долей аллеля *A* в образцах исследуемого СМ

№ лунки	ПДРФР-проба образца сухого молока	Экспериментальные данные			Шкала (доля аллеля А, %)	Теоретические данные по построенной шкале		
		Quantity 1	Quantity 2	ЧП		oQuantity 1	oQuantity 2	шЧП
1	СЦМ 1 (контроль) первой повт.	100,0	218,5	0,458	62,5	189,37	182,09	1,043
2	СЦМ 1 (контроль) второй повт.	100,0	249,1	0,401	63	187,34	183,54	1,021
Среднеарифметическое значение для лунок 1,2		100,0	233,8	0,428	63,6	184,3	185,29	0,994
3	СОМ 3 первой повт.	100,0	197,4	0,507	65	177,21	189,37	0,936
4	СОМ 3 второй повт.	100,0	166,4	0,601	74	131,65	215,59	0,611
Среднеарифметическое значение для лунок 3,4		100,0	181,9	0,553	75,85	122,28	220,98	0,553
5	СОМ 4 первой повт.	100,0	96,1	1,041	77	116,46	224,33	0,519
6	СОМ 4 второй повт.	100,0	105,5	0,948	78	111,39	227,24	0,490
Среднеарифметическое значение для лунок 5,6		100,0	100,8	0,994	80	101,27	233,07	0,434
7	СОМ 5 первой повт.	100,0	248,3	0,403	81	96,2	235,98	0,408
8	СОМ 5 второй повт.	100,0	260,6	0,384	81,55	93,42	237,59	0,393
Среднеарифметическое значение для лунок 7,8		100,0	254,45	0,393	82	91,14	238,9	0,381

Как видно из таблицы 19, по итогам соотнесения экспериментально полученного ЧП с шкальным шЧП было установлено, что относительная доля аллеля А в образце СОМ 3 составила 75,85% (Δ ± 1,55%; σ ± 2%), в образце СОМ 4 – 63,6% (Δ ± 1,1%; σ ± 1,7%), в образце СОМ 5 – 81,55% (Δ ± 0,35%; σ ± 0,45%).

В третьем примере в качестве контрольного образца использовали СОМ 1 с известной относительной долей аллеля А, равной 82,5%, а в качестве опытных

образцов: СОМ 6, СОМ 7, СОМ 8. На рисунке 13 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности для примера 3.

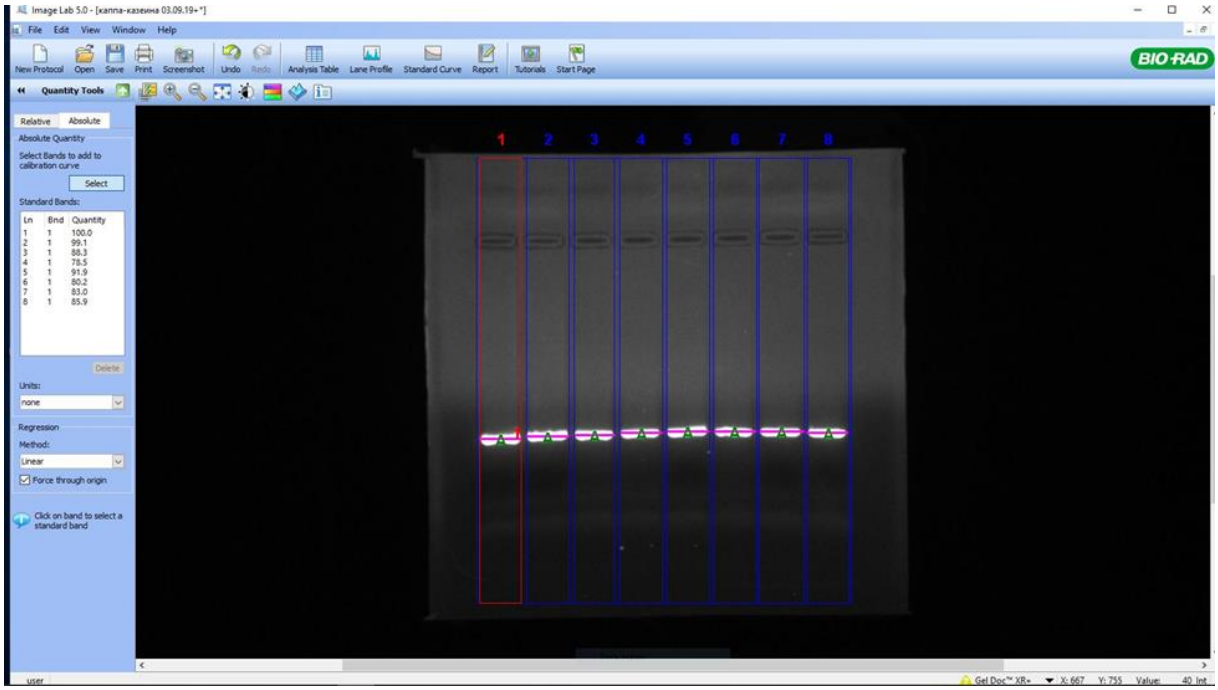


Рисунок 13 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПЦР-проб примера 3

В таблице 20 представлены полученные значения Quantity и рассчитанные объемы ПДРФ-проб, отбираемые для внесения в лунки второго агарозного геля в примере 3.

Таблица 20 – Значения Quantity анализируемых ПЦР-проб и отбираемые объемы ПДРФ-проб примера 3

№ п.п.	ПЦР-проба образца сухого молока	Quantity	Отбираемый объем ПДРФ-пробы, мкл
1	СОМ 1 (контроль) первой повторности	100	13
2	СОМ 1 (контроль) второй повторности	99,1	13,1
3	СОМ 6 первой повторности	88,3	14,7
4	СОМ 6 второй повторности	78,5	16,6
5	СОМ 7 первой повторности	91,9	14,1
6	СОМ 7 второй повторности	80,2	16,2
7	СОМ 8 первой повторности	83,0	15,7
8	СОМ 8 второй повторности	85,9	15,1

На рисунке 14 представлено изображение геля, полученное на компьютере при программном определении значения абсолютного количества (Quantity 1 и Quantity 2) детектируемых ПДРФ-фрагментов каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности примера 3.

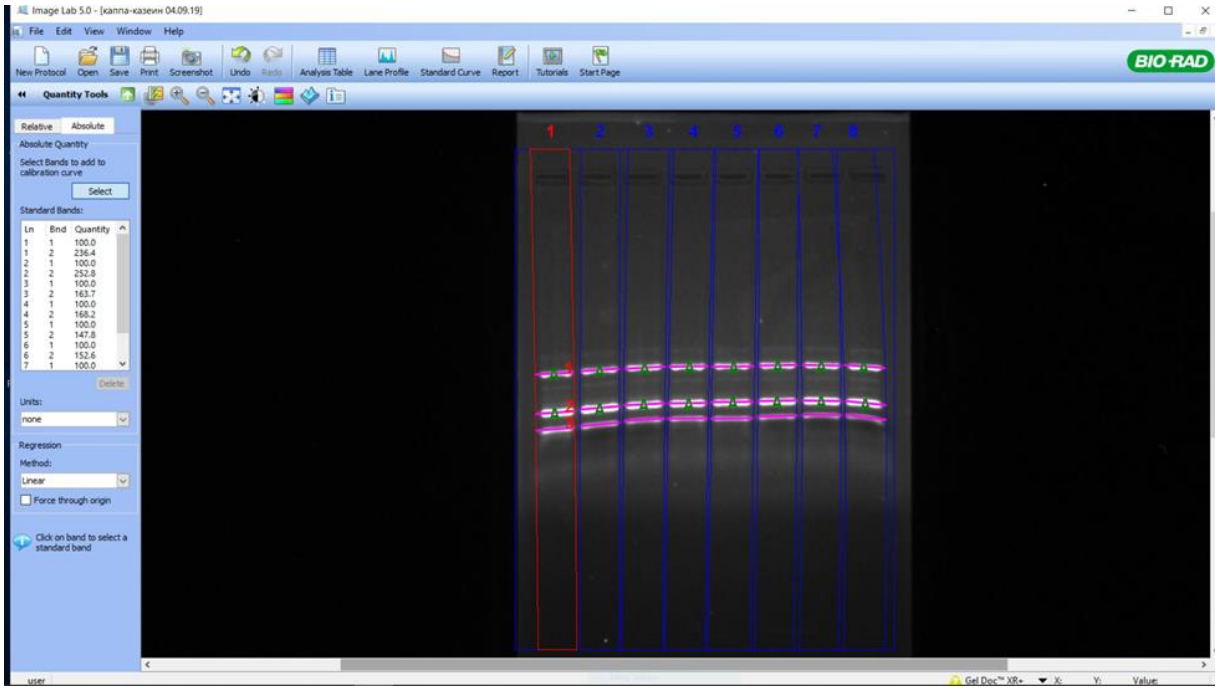


Рисунок 14 – Программная обработка анализируемых в двойной повторности ПДРФ-проб примера 3

Полученные в примере 3 результаты с рассчитанными показателями собраны в таблицу 21.

Как видно из таблицы 21, по итогам соотнесения экспериментально полученного ЧП с шкальным шЧП было установлено, что относительная доля аллеля *A* в образце СОМ 6 составила 76,2% (Δ ± 0,2%; σ ± 0,25%), в образце СОМ 7 – 74,25% (Δ ± 0,25%; σ ± 0,35%), в образце СОМ 8 – 76,8% (Δ ± 0,8%; σ ± 1,05%).

Для удобства математической обработки данных по разработанному алгоритму оценки была создана программа «Расчет соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном», которая размещена по адресу: https://tinyurl.com/alleling. Принцип ее работы, вносимые данные, а именно доля аллеля *A* контрольной ПДРФ-пробы, выраженная в процентах (к*A*,%); наблюдаемое (среднеарифметическое) значение Quantity для band 2 контрольной ПДРФ-пробы (н*Q* контроля); информация о исследуемом образце (наименование

образца); наблюдаемое (среднеарифметическое) значение Quantity для band 2 анализируемой ПДРФ-пробы (н*Q*2 образца), показаны на рисунке 15.

Таблица 21 – Пример 3 расчета относительных долей аллеля *A* в образцах исследуемого СМ

№ лунки	ПДРФР-проба образца сухого молока	Экспериментальные данные			Шкала (доля аллеля А, %)	Теоретические данные по построенной шкале		
		Quantity 1	Quantity 2	ЧП		oQuantity 1	oQuantity 2	шЧП
1	СОМ 1 (контроль) первой повт.	100,0	236,4	0,42	74	148,57	219,40	0,68
2	СОМ 1 (контроль) второй повт.	100,0	252,8	0,40	74,5	145,71	220,88	0,66
Среднеарифметическое значение для лунок 1,2		100,0	244,6	0,41	75	142,86	222,36	0,64
3	СОМ 6 первой повт.	100,0	163,7	0,61	76	137,14	225,33	0,61
4	СОМ 6 второй повт.	100,0	168,2	0,59	76,2	136	225,92	0,60
Среднеарифметическое значение для лунок 3,4		100,0	165,95	0,6	76,4	134,86	226,51	0,59
5	СОМ 7 первой повт.	100,0	147,8	0,68	76,8	132,57	227,70	0,583
6	СОМ 7 второй повт.	100,0	152,6	0,66	77	131,43	228,29	0,576
Среднеарифметическое значение для лунок 5,6		100,0	150,2	0,67	77,5	128,57	229,78	0,559
7	СОМ 8 первой повт.	100,0	179,4	0,557	77,6	128	230,07	0,556
8	СОМ 8 второй повт.	100,0	163,9	0,61	78	125,71	231,26	0,54
Среднеарифметическое значение для лунок 7,8		100,0	171,65	0,583	82,5	100	244,6	0,41

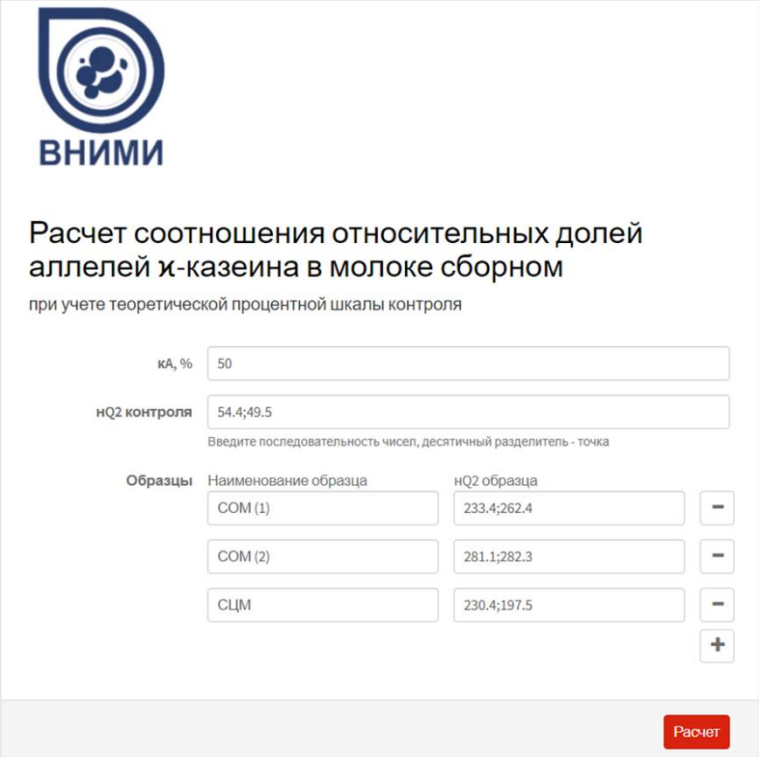
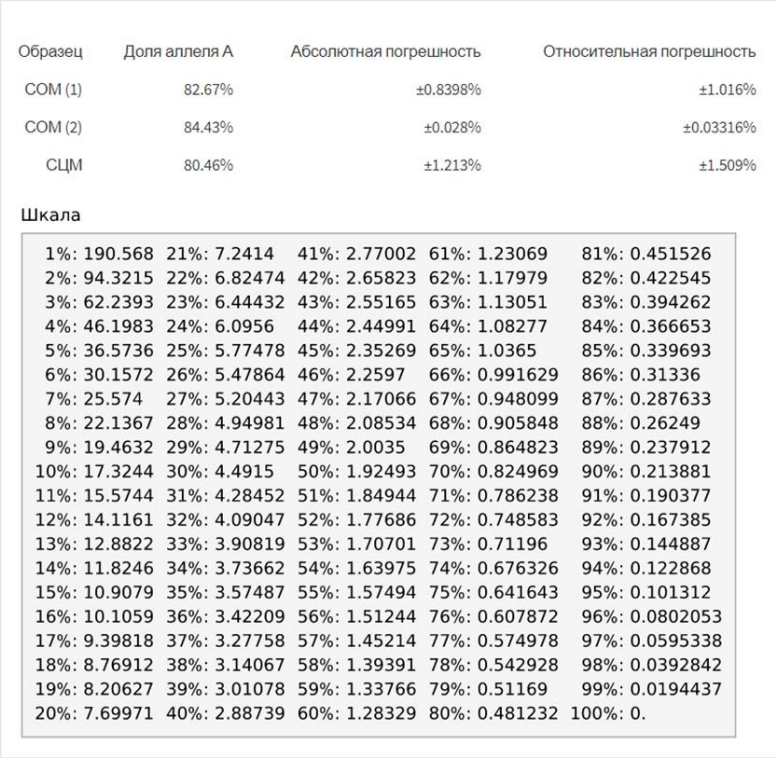


Рисунок 15 – Интерфейс разработанной программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном» на начальном этапе внесения соответствующих данных

Выданный программой результат расчета соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* в исследуемых образцах, выраженный в процентах доли аллеля *A* с дополнительным указанием абсолютной и относительной погрешностей, а также информационный блок сгенерированных числовых показателей для выстроенной процентной шкалы показаны на рисунке 16.



Образец	Доля аллеля A	Абсолютная погрешность	Относительная погрешность
COM (1)	82.67%	±0.8398%	±1.016%
COM (2)	84.43%	±0.028%	±0.03316%
СЦМ	80.46%	±1.213%	±1.509%

Шкала

1%: 190.568	21%: 7.2414	41%: 2.77002	61%: 1.23069	81%: 0.451526
2%: 94.3215	22%: 6.82474	42%: 2.65823	62%: 1.17979	82%: 0.422545
3%: 62.2393	23%: 6.44432	43%: 2.55165	63%: 1.13051	83%: 0.394262
4%: 46.1983	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%: 9.39818	37%: 3.27758	57%: 1.45214	77%: 0.574978	97%: 0.0595338
18%: 8.76912	38%: 3.14067	58%: 1.39391	78%: 0.542928	98%: 0.0392842
19%: 8.20627	39%: 3.01078	59%: 1.33766	79%: 0.51169	99%: 0.0194437
20%: 7.69971	40%: 2.88739	60%: 1.28329	80%: 0.481232	100%: 0.

Рисунок 16 – Интерфейс разработанной программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном» на заключительном этапе выдачи результата расчета

Таким образом разработана и апробирована методика по определению соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном и/или СМ. Создано программное обеспечение для оптимизации работы и накопления базы данных, алгоритм которого представлен на рисунке 17.

```
f = FormPage[
  {(*Column[{Style["Контроль",{Bold}],Style["---",White]}],*)
   {"kA", "кА, %"} → "Number",
   {"nQ2", "нQ2 контроля"} → <|"Interpreter" → DelimitedSequence["Number"],
     "Help" → "Введите последовательность чисел, десятичный разделитель - точка"|>,
   (*Column[{Style["Образцы",{Bold}],Style["---",White]}],*)
   {"nQ2o", "Образцы"} →
    RepeatingElement[
     CompoundElement[<|{"info", "Наименование образца"} → <|"Interpreter" → "String",
         "Default" :→ ToString@i|>, {"data", "нQ2 образца"} → DelimitedSequence["Number"]|>],
     {{i, 1}, {1, 10}}]},

  Module[{cnt, nQ2, nQ2o, allel, all1, allM, alleles, devs, ab},
    cnt = 100./Mean[#nQ2] #kA/(100 - #kA);
    allel[nQ_] := cnt/(100. / nQ + cnt);
    all1[nQ_List] := allel[Mean[nQ]];|
    all1[nQ_] := allel[nQ];
    allM[nQ_] := Map[allel, nQ];
    alleles = all1[#["data"]] & /@ #nQ2o;
    devs = (all1 /@ #["data"]) & /@ #nQ2o;
    ab[a_] := cnt (100 - a)/a;
    Column@{Grid[Prepend[MapThread[{
          #3["info"],
          ToString@PercentForm@#1,
          "±" ~~ ToString[PercentForm@MeanDeviation[#2]],
          "±" ~~ ToString@PercentForm[MeanDeviation[#2]/Mean[#2]]
         } &,
        {alleles, devs, #nQ2o}],
       StringSplit["Образец;Доля аллеля A;Абсолютная\nпогрешность;Относительная\nпогрешность",
        ";"]],
      Alignment → {{Right, Right, Left, Left}, Center}],
     ExportString[
      Panel[Grid[Transpose@Partition[Table[ToString[i] ~~ "%: " ~~ ToString[ab[i]], {i, 1, 100}], 20],
        Alignment → " "], "Шкала"], "SVG"]}
   ] &,
  AppearanceRules → <|
    "Title" -> Column[{ExportString[vnimi, "SVG"], Style["---", White],
       "Расчет соотношения относительных долей аллелей x-казеина в молоке сборном"}],
    "Description" → "при учете теоретической процентной шкалы контроля", "SubmitLabel" → "Расчет"|>
  ];
```

Рисунок 17 – Алгоритм программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей ϰ-казеина в молоке сборном»

3.4 Разработка технологии восстановленного стерилизованного молока с интегрированной методикой идентификации соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* для оценки технологических свойств

Стерилизованное питьевое молоко по праву считается одним из наиболее распространенных продуктов питания с высокой хранимоустойчивостью благодаря устранению основных дестабилизирующих факторов: активной микрофлоры, ферментных систем и др. При этом наличие водной фазы предполагает остаточную активность химических реакций и физических процессов. Соответственно, в классической технологии производства предусмотрено использование высококачественного сырья, наличие избыточного фактора технологического воздействия и регламентированных условий хранения [72, 83, 89].

Хранимоустойчивость стерилизованного молока главным образом зависит от интенсивности процессов седиментации, гелеобразования и отстоя сливок. Гелеобразование сопровождается увеличением вязкости и обусловливается тем, что значительная часть водной фазы улавливается в интерстициальных пространствах между агрегированными мицеллами белка. При седиментации происходит разделение коллоидной суспензии продукта на жидкую и твердую фазы, осаждение последней на дно упаковки и появление пороков вкуса (меловой привкус) и консистенции. Процессу сопутствует отстой жировой фазы. Возможно наличие отстоя и без седиментации, что обусловлено нарушением технологических режимов [83, 151].

Наиболее важным функционально-технологическим свойством сырья, направляемого на стерилизацию, является ТУ, которая определяет его пригодность к высокотемпературной обработке. В процессе тепловой обработки изменяется солевое равновесие молока, может произойти нарушение структуры казеиновых мицелл и частичная денатурация белков. ТУ молока обуславливается способностью казеина и сывороточных белков сохранять свои коллоидно-дисперсные свойства под воздействием повышенных температур. Основными

факторами устойчивости мицелл казеина являются величина поверхностного заряда и степень гидратации частиц.

Влияние данных факторов подробно рассмотрено в литературе для традиционных технологий [27, 59, 83, 87].

Область технологии восстановленного стерилизованного молока на сегодняшний день не имеет систематизированного научного обоснования. Технологии в большей степени получены эмпирически и не обоснованы, в том числе и в части термо- и хранимоустойчивости.

Соответственно на этом этапе исследования осуществлена разработка технологии производства восстановленного стерилизованного молока из СМП с интегрированной системой оценки ТУ путем учета соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*. В работе рассмотрены три градации продукта по жирности: 0,5%, 2,5% и 3,2%. Принципиальная технологическая схема производства продукта на лабораторном этапе представлена ниже – рисунок 18.

В рамках оценки качества СМ определяли массовую долю влаги, жира, белка в СОМО и лактозы в нем, а также индекс растворимости, группу чистоты, кислотность и тепловой класс для оценки состояния белкового комплекса молока. После оценки по нормируемым показателям образцы СЦМ подвергались молекулярно-генетической и биоинформационной оценке для определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*. Пороговым значением в соответствии с результатами, полученными в главе 3.2, являлось 75% содержание аллеля *A* в соотношении относительных долей аллелей гена *CSN3*.

В переработку допускалось сырье с титруемой кислотностью от 16 до 21 °Т, с индексом растворимости не более 0,2 см^3 сырого осадка, с группой чистоты не ниже I, среднетемпературного и выше среднего тепловых классов, и термоустойчивостью не ниже IV группы. Молоко I и II групп ТУ отправляли на стерилизацию без добавления солей-стабилизаторов.

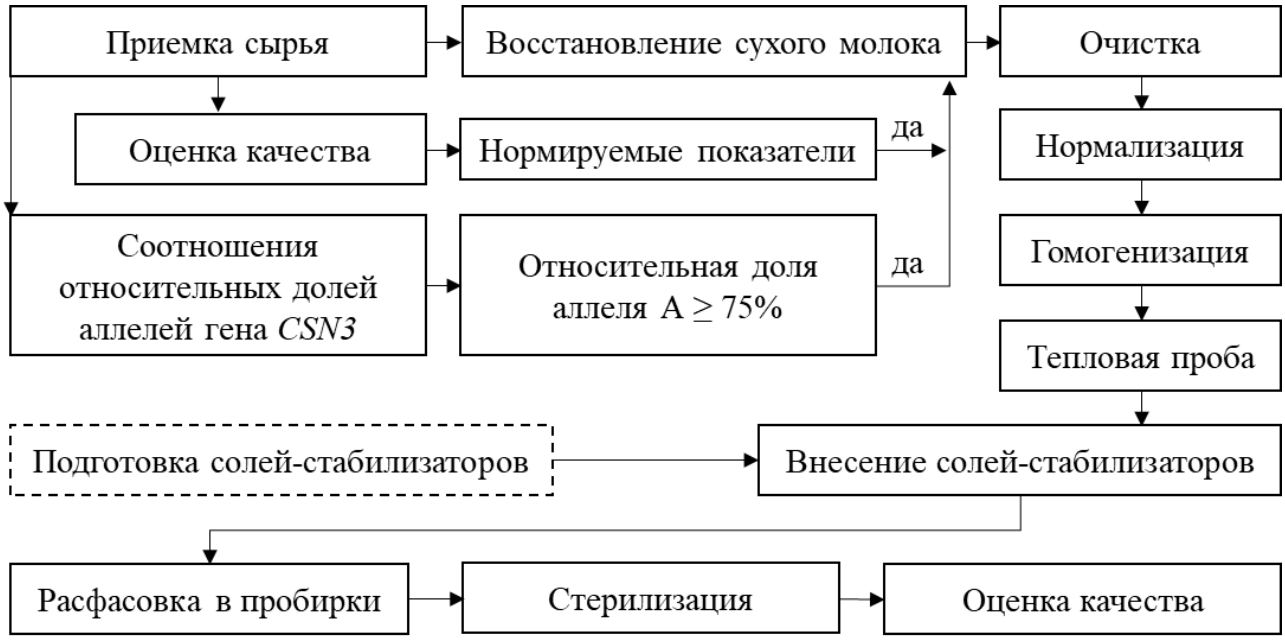


Рисунок 18 – Принципиальная схема лабораторного получения стерилизованного молока

Для получения ВМ с исходными параметрами сухих веществ (массовая доля жира 3,2 %) использовали формулу:

$$M_{\text{СМ}} = \frac{1000 \times \text{Н} \times \text{Ж}_{\text{М}}}{P \times \text{Ж}_{\text{СМ}}}, \quad (8)$$

где $\text{М}_{\text{СМ}}$ – масса СМ, кг; Н – норма расхода сырья с учетом потерь при 100%-ной его растворимости, кг; $\text{Ж}_{\text{М}}$ – массовая доля жира в ВМ, %; Р – фактическая растворимость СМ, %; $\text{Ж}_{\text{СМ}}$ – фактическая массовая доля жира в СМ, %.

Для получения нормализованного ВМ жирностью 2,5% и 0,5% использовали следующую формулу:

$$m_{\text{н}} \times \text{Ж}_{\text{н}} + m_{\text{обр}} \times \text{Ж}_{\text{обр}} = m_{\text{н}'} \times \text{Ж}_{\text{н}'}, \quad (9)$$

где $m_{\text{Н}}$ – масса ВМ, кг; $\text{Ж}_{\text{Н}}$ – массовая доля жира в ВМ, %; $m_{\text{обр}}$ – масса обезжиренного молока, кг; $\text{Ж}_{\text{обр}}$ – массовая доля жира в обезжиренном молоке; $m_{\text{Н}}'$ - масса нормализованного молока, кг; $\text{Ж}_{\text{Н}}'$ – массовая доля жира в нормализованном молоке, %.

Восстановление СЦМ проводили с использованием дистиллированной воды с pH (6,5±0,1) в соответствии с произведенными расчетами по экспериментально заданным параметрам с использованием магнитного перемешивающего

устройства при скорости 500 мин$^{-1}$ и температуре (40±2)ºС с выдержкой в течение 15 минут, после чего восстановленный продукт диспергировали на лабораторном плунжерном гомогенизаторе Manton Gaulin модель 15M8TA при давлении (15 ± 1) МПа и температуре (40 – 50)°С.

Для моделирования процесса стерилизации осуществляли ТП с использованием глицериновой бани, оснащенной системой механического перемешивания продукта, при температуре (130±1)°С в течение 15 минут в термоустойчивых пробирках объемом 10 мл. Если ТУ нормализованной смеси оказывалась ниже ожидаемой как дополнительный фактор стабилизации системы использовали соли-стабилизаторы: натрий лимоннокислый 5,5-водный по ГОСТ 22280 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5{,}5H_2O$; Е 331iii); калий лимоннокислый трехзамещенный 1-водный по ГОСТ 5538 ($K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$; Е 332ii); калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; Е 340iii); натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный по ГОСТ 4172 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; Е339ii). В работе дополнительно использовали соль «Фонакон» отечественного производства ОАО «Реатекс», представляющую собой смесь триполифосфатов натрия, кислого пирофосфата натрия с примесью орто- и других конденсированных фосфатов. Данные соединения характеризуются способностями регулировать pH среды; связывать катионы тяжелых и щелочноземельных металлов, в частности Ca^{2+} и Mg^{2+}; диспергировать в водных суспензиях твердых частиц, консервировать систему.

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.

Для определения оптимальной дозы солей-стабилизаторов в три емкости вместимостью 250 см^3 наливали по 100 см^3 проверяемого молока и добавляли водный раствор соли-стабилизатора с массовой долей соли в нем 10%. В первую колбу добавляли 0,1 см^3 раствора соли, во вторую - 0,2 см^3, в третью - 0,3 см^3. При этом массовая доля соли-стабилизатора в молоке составляла соответственно 0,01%; 0,02%; 0,03%. Смесь тщательно перемешивали, после чего определяли группу ТУ

по АП. Минимальная доза солей-стабилизаторов, повышающая ТУ молока до I или II группы в зависимости от производственной необходимости, являлась оптимальной дозой для исследуемой партии молока. Повышение ТУ молока выше II группы является нецелесообразным.

Массу соли-стабилизатора (Мс), которую необходимо внести в партию молока, рассчитывают в соответствии с установленной оптимальной дозой по формуле:

$$\mathrm{M_C} = \frac{\mathrm{K} \times \mathrm{M_M}}{100} \qquad (10)$$

где К - массовая доля (оптимальная доза) вносимой соли (0,01 - 0,03), %; $М_м$ - масса молока, кг.

Рассчитанную на всю партию массу соли-стабилизатора растворяли в прокипяченной горячей воде в соотношении масс 1:1, раствор фильтровали, вносили в молоко, тщательно перемешивали, проверяли ТУ, которая должна быть I или II группы по АП. Раствор соли вносили в нормализованное молоко непосредственно перед тепловой обработкой.

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

3.4.1 Методологические принципы выборки сухого молока

В рамках работы рассмотрены 118 образцов СМ различных производителей, выработанного в период весна-лето 2020 года. На рисунке 19 представлены данные распределения исследованных образцов молока по доминирующему в соотношении относительных долей аллелей гена *CSN3* варианту. При этом, поскольку в разделе 3.2 данной работы показано, что достоверно термоустойчивыми свойствами обладает молоко с соотношением аллелей *A* и *B* не менее (75:25)%, область значений на графике разделена на две основные зоны: (0-75)% и (75-100)% по аллелю *A*.

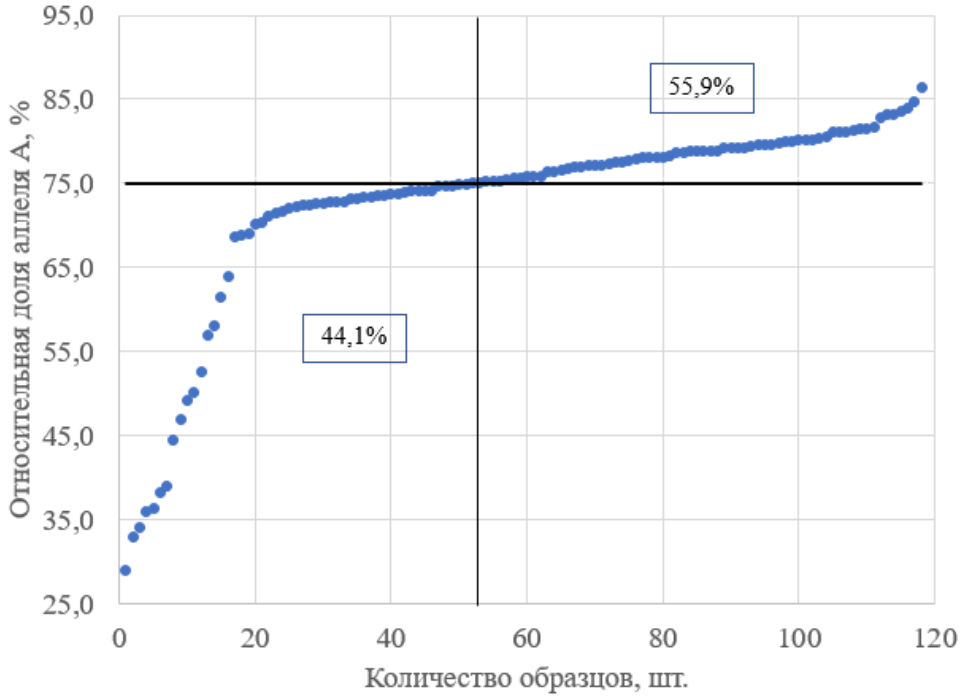


Рисунок 19 – Распределение содержания относительных долей аллеля *A* (%) в исследованных образцах СМ

Из представленных данных видно, что 44,1% (52 шт.) исследованных образцов находились в области соотношения (0:75)% относительных долей аллелей *B* и *A*, соответственно. Таким образом, 55,9% (66 шт.) образцов характеризовалось преобладанием аллеля *A* в соотношении относительных долей аллелей гена *CSN3*.

Следующим этапом работы проведены исследования по определению ТУ указанных образцов по АП и ТП. Для исследований отбирались образцы с группой ТУ V (5) и выше по АП. Данные представлены на рисунке 20.

На основании приведенных данных из дальнейших исследований были исключены 17 образцов, не выдержавших одну или обе из заявленных проб. Анализ полученных данных показывал отсутствие корреляционных зависимостей между АП и ТП.

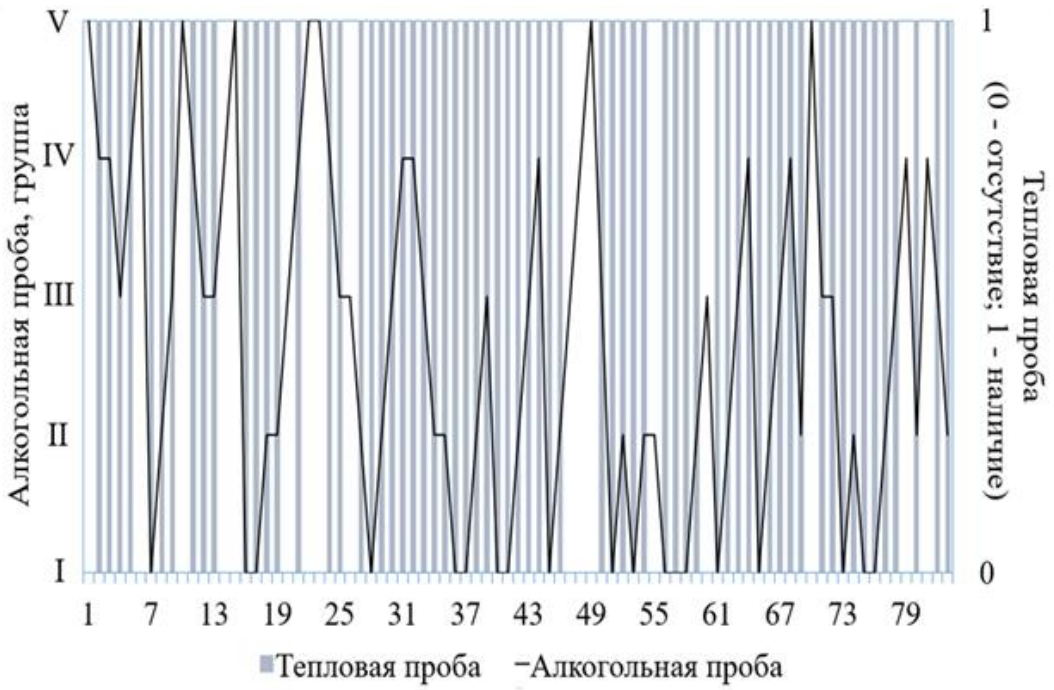


Рисунок 20 – Распределение образцов СМ по результатам АП и ТП

При этом, согласно полученным данным по АП, в исследованных образцах наблюдалось распределение образцов по группам, проиллюстрированное на рисунке 21.

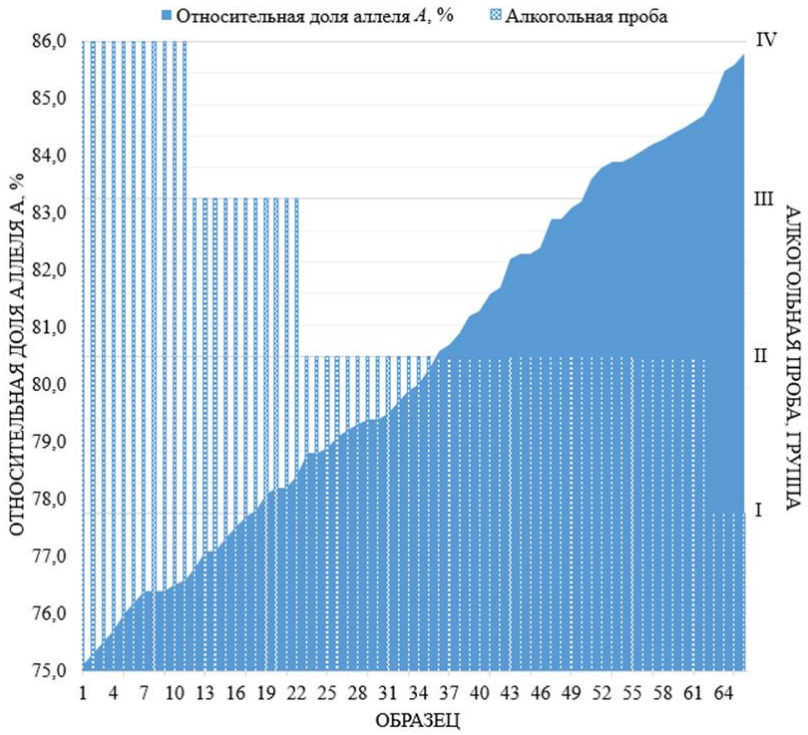
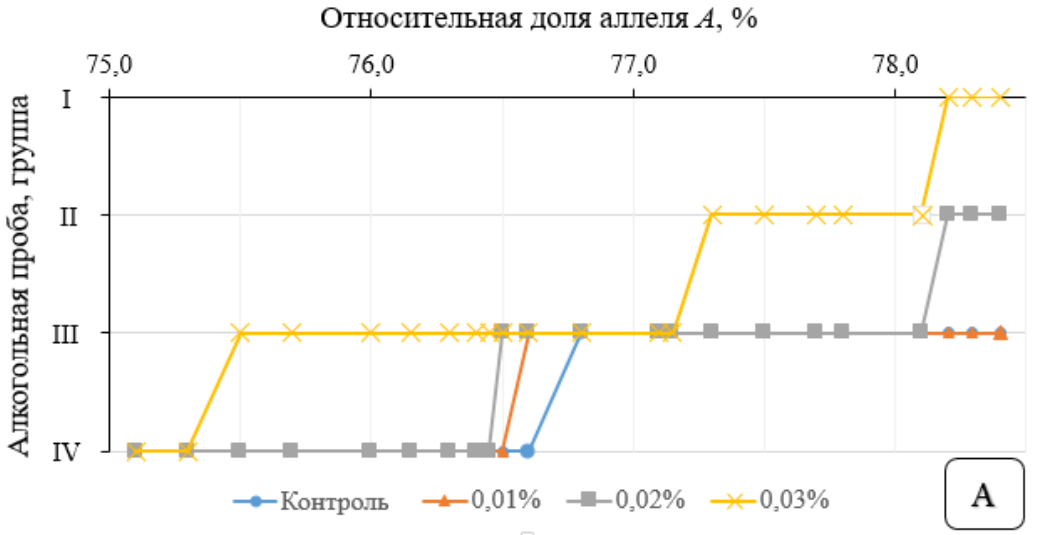
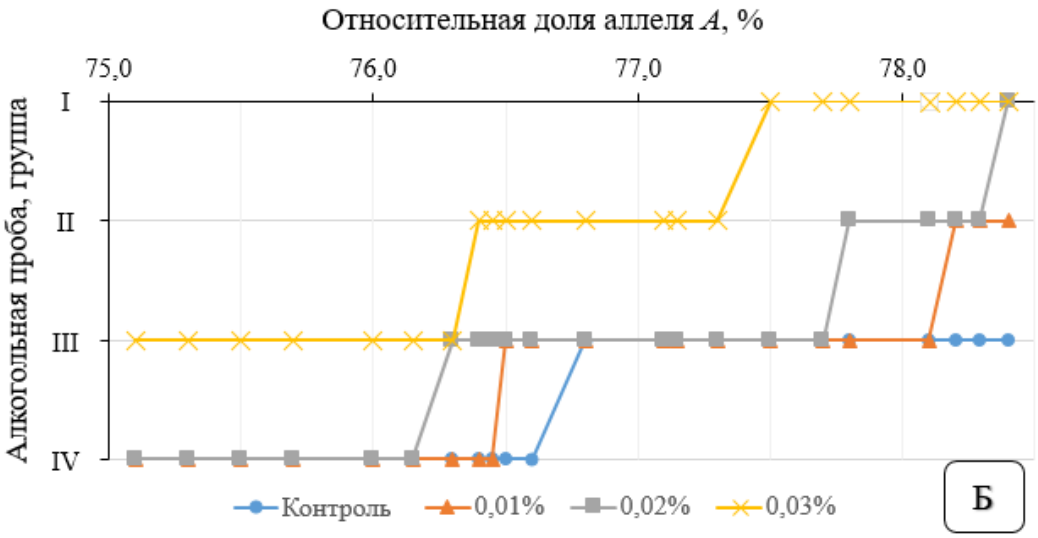
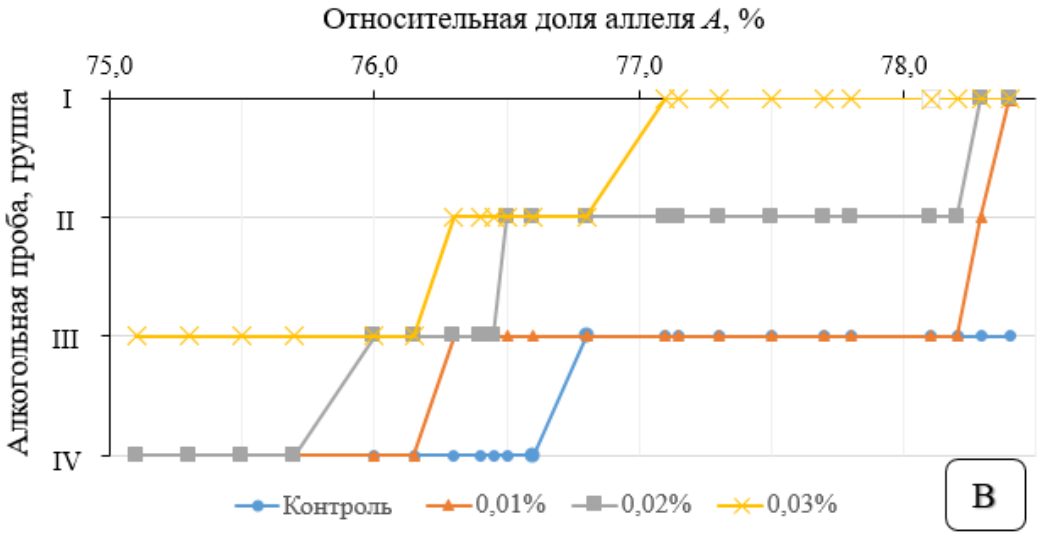


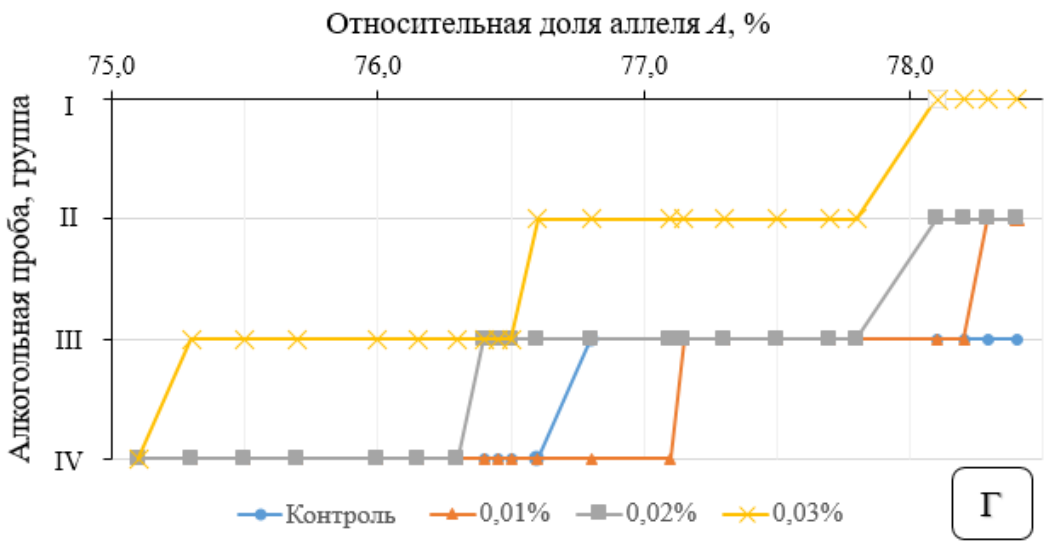
Рисунок 21 – Распределение образцов СМ по результатам АП с учетом относительной доли аллеля *A*, %

Исключив из выборки образцы I и II групп ТУ по АП, корректировке подвергнуты 22 образца IV и III группы ТУ. Результаты представлены на рисунках 22 (А-Д).









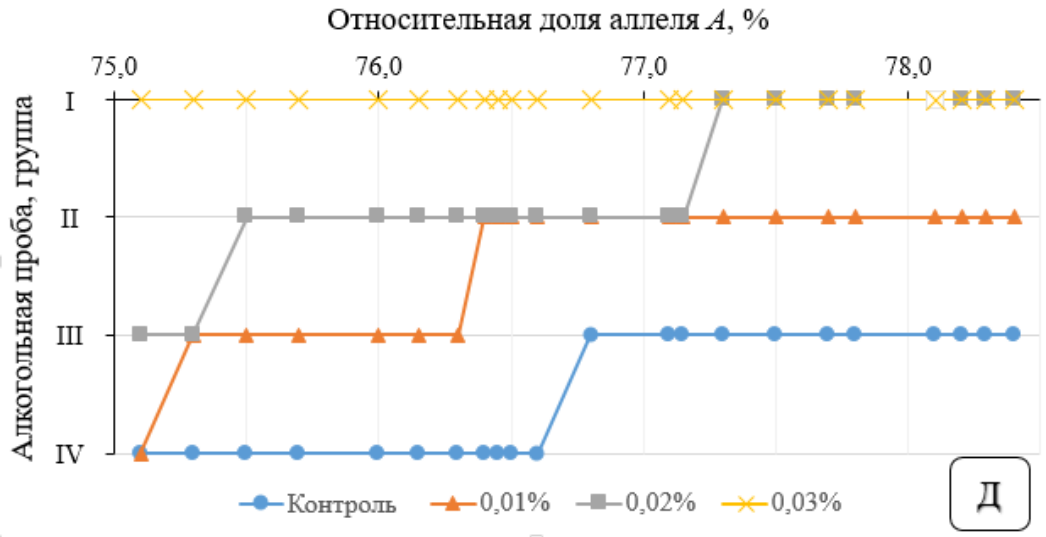


Рисунок 22 – Формирование ТУ у образцов IV и III группы в зависимости от вида и дозы соли-стабилизатора (А - $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5{,}5H_2O$; Б - $K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$; В - $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; Г - $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; Д - Фонакон)

Как видно из представленных данных наибольшая эффективность достигается от внесения полифосфатной соли Фонакон (рисунок Д). При максимально допустимой дозировке 0,03% ТУ всех образцов молока независимо от содержания относительной доли аллеля *A* достигала I группы. Минимальная дозировка соли – 0,01% также способствовала интенсивному повышению группы ТУ. Наименьшая эффективность от применения максимальной дозы соли-стабилизатора 0,03% получена при внесении $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; наибольшая - $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.

По результатам исследований установлена градация солей по эффективности их влияния при минимальной допустимой дозировке – 0,01%: Фонакон > $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ > $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5{,}5H_2O$ >. $K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ > $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$.

В целом результаты исследований достоверно демонстрируют зависимость количества внесенной соли-стабилизатора от содержания относительной доли аллеля *А*. Установлено, что с повышением его содержания ТУ молока значимо увеличивается.

Известно, что ТУ молока зависит от массовой доли белка в системе. Соответственно 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 в системе осуществляли путем добавления сухой лактозы и дистиллированной воды, а концентрирование – увеличением навески СМ. В качестве соли-стабилизатора использовали Фонакон с дозировкой 0,03%, использование которого показало наибольшую эффективность. Результаты представлены на рисунке 23.

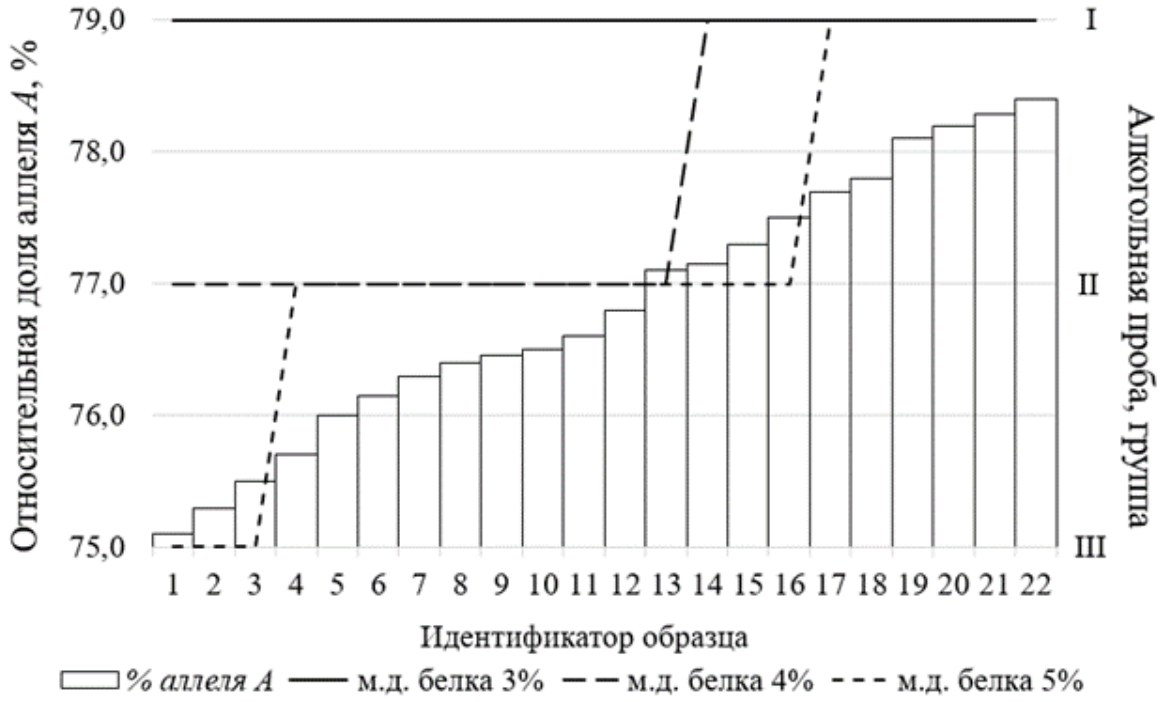


Рисунок 23 – Влияние массовой доли белка в системе на формирование ТУ ВМ

Как следует из представленных данных, повышение массовой доли белка в системе приводит к понижению ее ТУ. Также доказано влияние содержания относительной доли аллеля *А*. В частности, установлено, что при прочих равных условиях с повышением содержания относительной доли аллеля *А* ориентировочно более 76,0% ТУ молока повышается до II или I групп, что подтверждает целесообразность расширения области оценочных критериев качества СМ.

На следующем этапе определили влияние давления гомогенизации (15,0; 17,5; 20,0 и 22,5 (±2,5) МПа) на ТУ молока с учетом содержания аллеля *А* гена *CSN3*. Установлено, что в указанном диапазоне давления, ТУ системы достоверно не изменяется. При этом установлено, что эффективность гомогенизации обеспечивается при давлении (20±2,5) МПа.

Проведенные исследования позволили разработать технологию восстановленного стерилизованного молока с интегрированными в область оценочных критериев сухого сырья молекулярно-генетической и биоинформационной системой оценки доминирующего аллельного варианта гена *CSN3*.

3.4.2 Частная технология восстановленного стерилизованного молока с обоснованным молекулярно-генетическим методом подбором сухого молочного сырья

Восстановленное стерилизованное молоко производят из СМ (СОМ, СЦМ или их смеси), прошедшего комплексную молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки, путем его восстановления водой с последующей обработкой с использованием различных технологических операций (рисунок 24). Допускается использовать в производстве СМ с относительной долей аллеля *А* 75% и более.

Для восстановления СМП используют воду, прошедшую дополнительную ионообменную или обратноосмотическую обработку с целью очистки, в том числе на молекулярном уровне.

Нормализацию смеси по жиру осуществляют путем сепарирования и/или смешивания восстановленного молока с обезжиренным и/или добавлением жиросодержащих компонентов. Нормализованное восстановленное молоко после очистки и охлаждения должно храниться до пастеризации не более 1 часа.

Рисунок 24 – Принципиальная схема производства восстановленного стерилизованного молока

Перед направлением на стерилизацию проверяют ТУ восстановленной нормализованной смеси. Молоко ТУ по АП I и II групп направляется на стерилизацию без добавления соли-стабилизатора. В молоко III и IV групп по АП вводят соли-стабилизаторы из раздела 3.4.1 для повышения ТУ минимум до II группы. Более чем двукратное внесение соли—стабилизатора не допускается при ограничивающем условии, что суммарная доля ввода не должна превышать 0,03%.

Вариант 1. Технология классическая (рисунок 25).

Подготовленное для стерилизации молоко предварительно нагревают до (80±2)ºС и деаэрируют с применением соответствующего оборудования при разряжении (0,06±0,02) МПа. Непосредственно после деаэрации молоко направляют на гомогенизацию, которую осуществляют при (20,5±2,5) МПа. Гомогенизированное молоко охлаждают до (25±2)ºС, упаковывают в тару и стерилизуют при температуре при температуре (118±2)ºС с выдержкой не менее 25 с и охлаждают. Тару маркируют. Продукт готов к хранению и реализации.

Вариант 2. Технология с асептическим розливом (рисунок 26).

Подготовленное для стерилизации молоко предварительно нагревают до (80±2)ºС и деаэрируют с применением соответствующего оборудования при разряжении (0,06±0,02) МПа. Непосредственно после деаэрации молоко направляют на гомогенизацию, которую осуществляют при (20,5±2,5) МПа. Гомогенизированное молоко подогревают до (108±2)ºС в регенеративной секции стерилизационной установки и затем стерилизуют при температуре (139±2)ºС с выдержкой не менее 5 с и охлаждают. Охлажденное до 25ºС в потоке стерилизованное молоко разливают в асептических условиях, тару маркируют. Продукт готов к хранению и реализации.

Независимо от технологии производства молоко стерилизованное должно соответствовать требованиям СТО. По органолептическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, указанным в таблице 22.

Таблица 22 – Органолептические показатели восстановленного стерилизованного молока

Наименование показателя	Характеристика продукта
Внешний вид и консистенция	Однородная жидкость без наличия хлопьев белка. Допускается небольшой отстой жира и небольшой осадок на дне тары, растворяющийся при встряхивании
Вкус и запах	Чистый молочный, с легким привкусом кипяченного молока
Цвет	От белого до слегка кремового

По физико-химическим показателям продукт должен соответствовать требованиям, указанным в таблице 23.

Таблица 23 – Физико-химические показатели восстановленного стерилизованного молока

Наименование показателя	Норма для продукта с массовой долей жира, %		
	0,5	2,5	3,2
Массовая доля жира, %, не менее	0,5	2,5	3,2
Кислотность, °Т, не более	20		
Плотность, кг/м3, не менее	1027		
Чистота по эталону, группа, не менее	1		
Температура при выпуске с предприятия, °С, не выше	25		

По микробиологическим показателям продукт должен отвечать требованиям промышленной стерильности, установленным в регламенте о безопасности молока и молочной продукции (ТР ТС 033/2013):

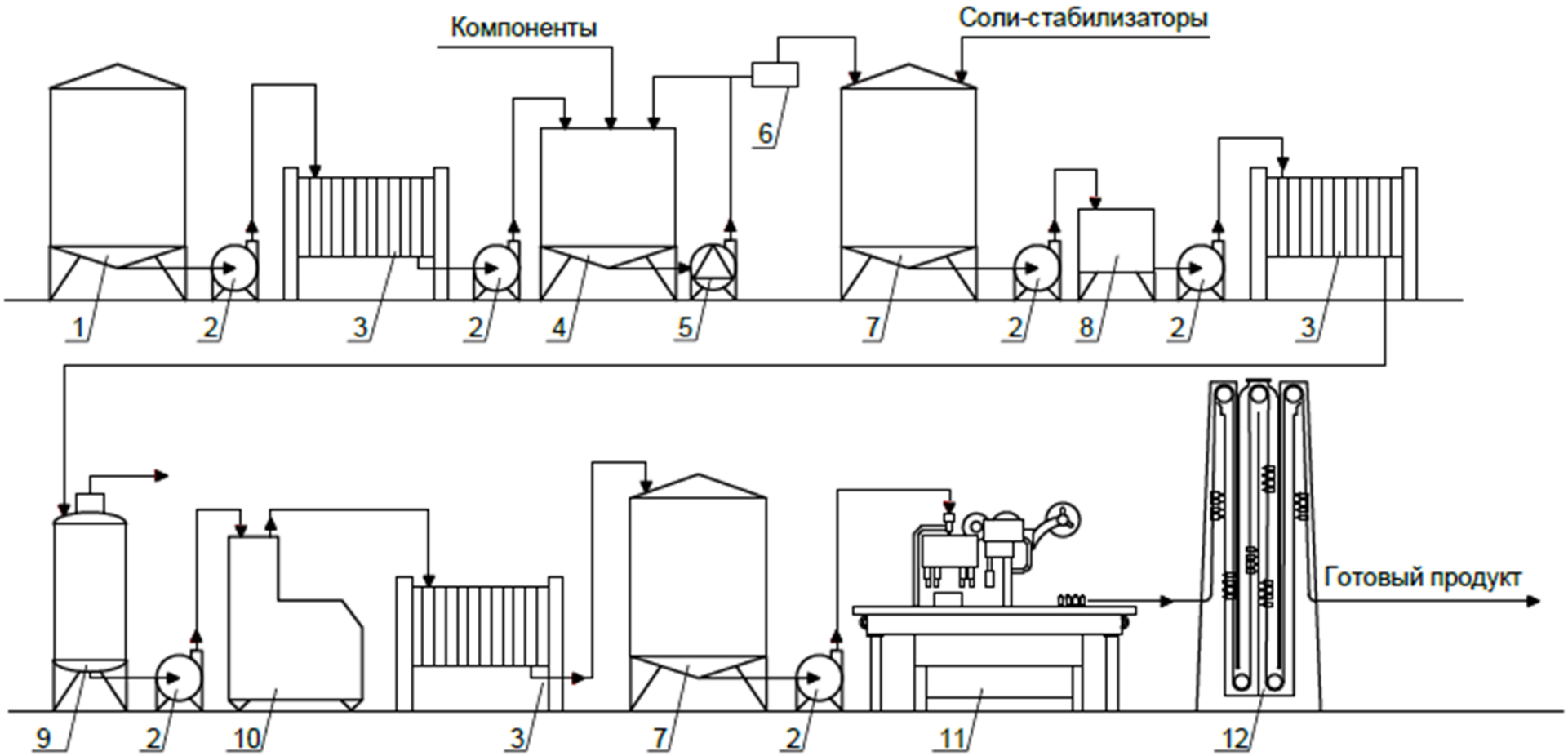
1) отсутствие видимых дефектов и признаков порчи (вздутие упаковки, изменение внешнего вида и другие), а также изменений вкуса и консистенции после термостатной выдержки при температуре 37 °С в течение 3-5 суток;

2) допускаются изменения титруемой кислотности не более чем на 2 °Т и показателя КМАФАнМ не более 10 КОЕ/см^3 (г).

Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ (токсичных элементов, пестицидов, микотоксинов, диоксинов, меламина, антибиотиков, радионуклидов) в продукте не должны превышать норм, установленных регламентами о безопасности пищевой продукции (ТР ТС 021/2011) и о безопасности молока и молочной продукции (ТР ТС 033/2013) – таблица 24.

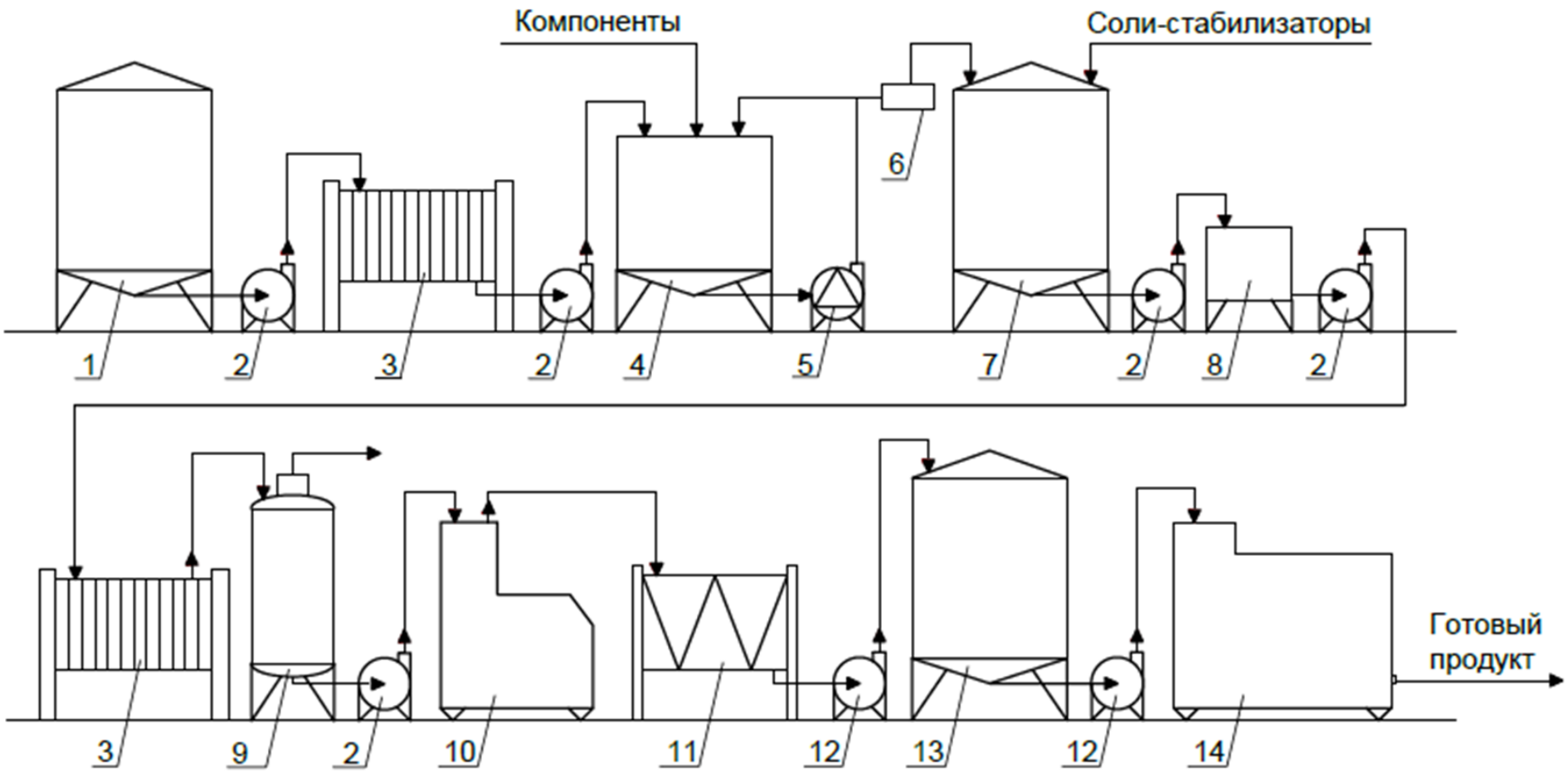
Таблица 24 – Допустимые уровни содержания потенциально опасных веществ в восстановленном стерилизованном молоке

Потенциально опасные вещества	Допустимые уровни
Токсичные элементы, мг/кг, не более: - свинец - мышьяк - кадмий - ртуть	 0,1 0,05 0,03 0,005
Афлатоксин M_1, мг/кг, не более	0,0005
Антибиотики (левомицетин, тетрациклиновая группа, стрептомицин, пенициллин), мг/кг, менее	Не допускаются
Пестициды, мг/кг, не более (в пересчете на жир): - гексахлорциклогексан (α,β,γ - изомеры) - ДДТ и его метаболиты	0,05
Радионуклиды, Бк/л, не более: - удельная активность цезия-137 - удельная активность стронция-90	 100 25
Диоксины, мг/кг, не более (в пересчете на жир)	менее 0,000003
Меламин, мг/кг	Не допускается (< 1,0)



1. Резервуар для подготовленной воды
2. Насос
3. Пластинчатая пастеризационно-охладительная установка
4. Установка для восстановления молока
5. Роторно-пульсационный аппарат
6. Счетчик
7. Резервуар для промежуточного хранения
8. Уравнительный бачок
9. Дезодоратор
10. Гомогенизатор
11. Фасовочно-укупорочная машина
12. Гидростатический стерилизатор

Рисунок 25 - Аппаратурно-технологическая схема производства ВМ, стерилизованного в упаковке



1. Резервуар для подготовленной воды
2. Насос
3. Пластинчатая пастеризационно-охладительная установка
4. Установка для восстановления молока
5. Роторно-пульсационный аппарат
6. Счетчик
7. Резервуар для промежуточного хранения
8. Уравнительный бачок
9. Дезодоратор
10. Гомогенизатор
11. Стерилизационная установка
12. Асептический насос
13. Асептический резервуар для промежуточного хранения
14. Асептический расфасовочный автомат

Рисунок 26 – Аппаратурно-технологическая схема производства ВМ, стерилизованного с асептическим розливом

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология восстановленного стерилизованного молока 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 *A* аллеля 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 СМ.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Амплификатор (термоциклер) – прибор, предназначенный для проведения ПЦР.

Амплификация – процесс многократного копирования специфического участка ДНК, ограниченного (фланкированного) праймерами.

АП – алкогольная проба.

Буфер – смесь катионов и анионов определенной концентрации, обеспечивающая оптимальные условия реакции и стабильное значение pH.

Ген – сегмент молекулы ДНК, содержащий код для аминокислотной последовательности полипептидной цепи либо функциональной РНК.

Генетические маркеры – нуклеотидные последовательности с известной первичной структурой, которые позволяют проводить идентификацию анализируемой ДНК.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

кДа – килодальтон.

ККП – кислотно-кипятильная проба.

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

КРС – крупный рогатый скот.

М.д. – массовая доля.

ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

Праймеры – последовательности нуклеотидов длиной 20-25 п.о., комплементарные концевым участкам изучаемого гена.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

СМ – сухое молоко.

СМП – сухие молочные продукты.

СОМ – сухое обезжиренное молоко.

ССС – способность к сычужному свертыванию.

СЦМ – сухое цельное молоко.

ТП – тепловая проба.

ТР ТС – Технический регламент Таможенного союза.

ТУ – термоустойчивость.

ФП – фосфатная проба.

ХП – хлоркальциевая проба.

BLG – ген бета-лактоглобулина.

bp – base pair (п.о. – пары оснований).

CSN1S1 – ген альфа *S1*-казеина.

CSN2 – ген бета-казеина.

CSN3 – ген $\varkappa$-казеина (каппа-казеина).

HindIII, *HinfI* – эндонуклеазы рестрикции.

LALBA – ген альфа-лактальбумина.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авчухова, А. Стерилизованное молоко: обзор рынка / А. Авчухова // Молочная промышленность. – 2013. – № 1. – С. 15-16.

2. Артемьев, А.М. Молочная продуктивность и технологические свойства молока коров черно-пестрой породы с различными генотипами каппа-казеина и сезонами отела: дис. …канд.с.-х.наук : 06.02.04 / Артемьев Александр Михайлович. – Москва, 2007. – 98 с.

3. Ахметов, Т.М. Качество и технологические свойства сыра, изготовленного из молока коров с разными генотипами каппа-казеина / Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2009. – № 1. – С. 20-23.

4. Ачкасова, Е.В. Влияние паратипических факторов на молочную продуктивность и технологические свойства молока коров-первотелок черно-пестрой породы: дис. ... к. с. – х. наук : 06.02.04 / Елена Валерьевна Ачкасова. – Ижевск, 2009. - 166 с.

5. Батанов, С.Д. Влияние пробиотической добавки на молочную продуктивность и качество молока коров / С.Д. Батанов, О.Ю. Князева // Аграрная наука. – 2011. – № 12. – С. 17-18.

6. Башаева, Д.В. Термоустойчивость коровьего молока, ее генетическая и паратипическая изменчивость: дис. …канд. биол. наук : 06.02.07 / Башаева Диана Валерьевна. – Казань, 2010. – 160 с.

7. Бигаева, А.В. Современное обеспечение водоподготовки в технологии восстановленного молока / А.В. Бигаева, С.Н. Туровская // Переработка молока. – 2020. – № 1 (243). – С. 22-25.

8. Буйлова, Л.А. Термоустойчивость молока-сырья / Л.А. Буйлова, А.В. Фомина // Переработка молока. – 2008. – № 10. – С. 18-19.

9. Бурыкин, А.И. О физической модели процесса растворения сухого молока / А.И. Бурыкин // Молочная промышленность. – 2019. – № 10. – С. 16-19.

10. Бурыкин, А.И. Сухое быстрорастворимое молоко можно производить и сегодня / А.И. Бурыкин // Молочная промышленность. – 2014. – №12. – С. 45-47.

11. Бурыкин, А.И. Физическая модель и некоторые теоретические положения процесса растворения сухого молока / А.И. Бурыкин // Молочная промышленность. – 2014. – № 12. – С. 47-48.

12. Бычкова, В.А. Термоустойчивость сырого молока основных перерабатывающих предприятий Удмуртской Республики и показатели, влияющие на нее / В.А. Бычкова, О.С. Уткина // Вестник Ижевской ГСХА. – 2012. – № 2 (31). – С. 39-41.

13. Валитов, Ф.Р. Влияние полиморфизма молочных белков на качество и технологические свойства молока / Ф.Р. Валитов, И.Ю. Долматова. – 10-я Всеросс. конференция-школа молодых учёных с международным участием «Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных, БиоТехЖ – 2015», Дубровицы: ВИЖ им. Л.К. Эрнста, 2015. – С. 50-56.

14. Вафин, Р.Р. Оптимизация способов генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиулллина, [и др.] // Ветеринарная практика. – 2007. – № 2 (37). – С. 54-59.

15. Вафин, Р.Р. Способ проведения аллель-специфичной ПЦР для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена каппа-казеина. Патент на изобретение РФ № 2337141 / Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, Э.Ф. Валиуллина, О.Г. Зарипов, Р.Р. Вафин // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 27.10.2008. – Бюл. № 30.

16. Вафин, Р.Р. Способ проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *B* гена *CSN3*. Патент на изобретение РФ № 2701648 / Р.Р. Вафин, С.В. Тюлькин, А.В. Муратова, [и др.] // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 01.10.2019. – Бюл. № 28.

17. Галстян, А.Г. Водоподготовка – фактор повышения экономической эффективности предприятий / А.Г. Галстян, В.В. Червецов, С.Н. Туровская, А.Н. Шкловец // Молочная промышленность. – 2011. – № 2. – С.58-60.

18. Галстян, А.Г. К вопросу восстановления сухих молочных продуктов / А.Г. Галстян, А.Н. Петров, Г.А. Фролов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. – № 5. – С. 37-39.

19. Галстян, А.Г. Перспективные способы предварительной термической обработки молока-сырья / А.Г. Галстян, А.Н. Петров // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. – № 3. – С. 11-13.

20. Галстян, А.Г. Развитие научных основ и практические решения совершенствования технологий, повышения качества и расширения ассортимента молочных консервов: автореф. дис. … д.т.н.: 05.18.04 / Галстян Арам Генрихович – Москва, 2009. – 50 с.

21. Галстян, А.Г. Способ производства сухого молока с повышенной термоустойчивостью и растворимостью. Патент на изобретение РФ № 2248130 / А.Г. Галстян, В.В. Павлова, В.Д. Харитонов, А.Н. Петров, И.А. Радаева // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 20.03.2005. – Бюл. № 8.

22. Галстян, А.Г. Теория и практика молочно-консервного производства / А.Г. Галстян, А.Н. Петров, И.А. Радаева, [и др.]. – М.: Издательский дом «Федотов Д.А.», 2016. – 181 с.

23. Ганган, В.И. Комплексная оценка молока коров симментальской породы различных генотипов: дис. ... канд. с.-х. н.: 06.02.10 / Василий Иванович Ганган. – Ставрополь, 2013. – 126 с.

24. Геворкян, К.А. К вопросу о эффективности технологического потенциала формирования качества сухого молока / К.А. Геворкян // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2017. – Т. 230 (2). – С. 55-59.

25. Гладырь, Е.А. Использование генов бета-лактоглобулина и каппа-казеина в качестве генетических маркеров для крупного рогатого скота / Е.А. Гладырь, Н.А. Зиновьева, Н.С. Марзанов, Г. Брем. – материалы II Междунар. науч. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». М.: ВНИИСХБ, 2000. С. 86-88.

26. Гончаренко, Г.М. Полиморфизм гена к-казеина и сыродельческие признаки молока коров симментальской породы / Г.М. Гончаренко, Т.С. Горячева, Н.С. Медведева, Н.Б. Гришина, Е.Г. Акулич, Е.В. Кононенко // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 10. – С. 45-46.

27. Горбатова К.К. Химия и физика молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2012. – 330 с.

28. Грашин, А.А. Влияние генотипов каппа-казеина на хозяйственно-полезные признаки скота самарского типа черно-пестрой породы: дис. …канд. б. н.: 06.02.07 / Алексей Александрович Грашин. – п. Лесные Поляны Московской области, 2011. – 107 с.

29. Гудзь, В.П. Соматические клетки и их влияние на качество и технологические свойства молока (обзор) / В.П. Гудзь, В.Н. Белявский // Экология и животный мир. – 2019. – № 1. – С. 49-53.

30. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А.В. Гудков. – Москва: ДеЛи принт, 2004. – 804 с.

31. Гунькова, П.И. Влияние плазмина на свойства молока / П.И. Гунькова, К.К. Горбатова // Молочная промышленность. – 2009. – № 8. – С. 52-53.

32. Диланян, З.Х. Сыроделие / З.Х. Диланян. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 280 с.

33. Донскова, Л.А. Сравнительная оценка белкового компонента паштетов из мяса птицы / Л.А. Донскова, Н.М. Беляев // Новые технологии. – 2016. – № 1. – С. 17-24.

34. Ермошина, Е.В. Молочная продуктивность и технологические свойства молока коров черно-пестрой и айрширской пород в зависимости от сезона отела: дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Елена Викторовна Ермошина. – Москва, 2009. – 111 с.

35. Жакслыкова, С.А. Подходы к оптимизации состава сбалансированных мясопродуктов / С.А. Жакслыкова, Р.Э. Хабибуллин, О.А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17, № 21. – С. 242-247.

36. Закирова, Г.М. Белковый состав и технологические свойства молока у помесных коров холмогорская Х голштинская разного генотипа : дис. … канд. биол. наук : 06.02.01 / Галима Мухтаровна Закирова. – Казань, 2002. – 146 с.

37. Зачем запретили импорт из Ирана и чем это грозит отрасли [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://milknews.ru/longridy/Zachem-zapretili-import-iz-Irana.html.

38. Зеленина, А.С. Молочная продуктивность и азотистый обмен коров при разном аминокислотном составе обменного протеина в рационе: дис. ... канд. биол. наук : 06.02.08 / Анна Станиславовна Зеленина. – Боровск, 2011. – 127 с.

39. Зиновьева, Н.А. Роль ДНК-маркеров признаков продуктивности сельскохозяйственных животных / Н.А. Зиновьева, О.В. Костюнина, Е.А. Гладырь, [и др.] // Зоотехния. – 2010. – № 1. – С. 8-10.

40. Иванов, И.В. Влияние породы скота на состав молока и производство сыра: дис. … канд. техн. наук : 05.18.04 / Игорь Владимирович Иванов. – Кемерово, 2007. – 123 с.

41. Инихов, Г.С. Методы анализа молока и молочных продуктов / Г.С. Инихов, Н.П. Брио. – Москва: Пищевая промышленность, 1971. – 423 с.

42. Инструкция по применению комплекта реагентов для экстракции ДНК из биологического материала [Электронный ресурс]. – Режим доступа: amplisens.ru/upload/iblock/299/ДНК-сорб-С-М.pdf.

43. Калашникова, Л.А. Молочная продуктивность коров черно-пестрой породы с различными генотипами каппа-казеина / Л.А. Калашникова, Е.А. Денисенко, А.Ш. Тинаев // Молочная промышленность. – 2009. – № 4. – С. 52-53.

44. Калашникова, Л.А. Оценка полиморфизма комплексных генотипов *CSN3, LGB, PRL, GH, LEP* и молочной продуктивности у холмогорских коров / Л.А. Калашникова, Я.А. Хабибрахманова, И.Е. Багаль, В.Л. Ялуга, В.П. Прожерин // Молочной и мясное скотоводство. – 2019. – № 2. – С. 14-17.

45. Климова, Е.Н. Состав и технологические свойства молока коров черно-пестрой породы в Московской области: дис. … канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Елена Николаевна Климова. – п. Дубровицы, Московской области, 2000. – 116 с.

46. Кобзева, Т.В. Оценка показателей качества и идентификационных характеристик сухого молока / Т.В. Кобзева, Е.А. Юрова // Молочная промышленность. – 2016. – № 3. – С. 32-35.

47. Кокорина, Н.В. Термоустойчивость молока в зависимости от периода лактации, времени доения коров и сезона года : дис. … канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Кокорина Наталья Васильевна. – Москва, 1999. – 120 с.

48. Костюнина, О.В. Молекулярная диагностика генетического полиморфизма основных молочных белков и их связь с технологическими свойствами молока : дис. … канд. биол. наук : 03.00.23 / Костюнина Ольга Васильевна. – Дубровицы, 2005. – 128 с.

49. Костюнина, О.В. Характеристика аллелофонда башкирских популяций крупного рогатого скота по генам *CSN2* и *CSN3* / О.В. Костюнина, Е.Н. Коновалова, И.Ю. Долматова, [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 3. – С. 64-67.

50. Кручинин, А.Г. Роль технологических свойств сухого молока в формировании качества пищевых систем / А.Г. Кручинин, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева, С.Н. Туровская // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 8 (161). – С. 166-173.

51. Липатов, Н.Н. Восстановленное молоко / Н.Н. Липатов, К.И. Тарасов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 256 с.

52. Липатов, Н.Н. Сухое молоко / Н.Н. Липатов, В.Д. Харитонов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 264 с.

53. Лоретц, О.Г. Влияние технологии содержания и кратности доения на продуктивность коров и качество молока / О.Г. Лоретц // Аграрный Вестник Урала. – 2013. – № 8 (114). – С. 72-74.

54. Лоретц, О.Г. Молочная продуктивность и технологические свойства молока различных генотипов по каппа-казеина / О.Г. Лоретц // Ветеринария Кубани. – 2014. – № 2. – С. 6-8.

55. Михайлова, Ю.А. Белковомолочность и технологические свойства молока коров с разными генотипами каппа-казеина : дис. канд. с.-х. наук : 06.02.07 / Михайлова Юлия Александровна. – Ярославль, 2016. – 131 с.

56. Михайлова, Ю.А. Использование метода генетического маркирования для повышения белковомолочности и улучшения технологических свойств молока коров / Ю.А. Михайлова, Р.В. Тамарова // Вестник АПК Верхноволжья. – 2019. – № 1 (45). – С. 42-45.

57. Мухаметгалиев, Н.Н. Использование генетической и паратипической изменчивости белкового состава молока коров для улучшения технологических свойств сырья и повышения качества молочных продуктов: дис. …д-ра. б. н.: 06.02.01 / Нурвахит Нургалиевич Мухаметгалиев. – Казань, 2006. – 289 с.

58. Мухаметшина, А.Р. Термоустойчивость молока коров в период завершения лактации / А.Р. Мухаметшина, Н.Н. Мухаметгалиев // Ученые записки КГАВМ имени Н.Э. Баумана. – 2010. – № 202. – С. 152-156.

59. Остроумова, Т.А. Химия и физика молока: учебное пособие / Т.А. Остроумова. – Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. – 196 с.

60. Павлова, Н.И. Вариабельность генов крупного рогатого скота Якутии и их действие на молочную продуктивность : дис. канд. биол. наук : 06.02.07 / Павлова Надежда Ивановна. – Якутск, 2017. – 140 с.

61. Павлова, Н.И. Полиморфизм генов молочных белков у коров холмогорской породы в условиях Республики Саха (Якутия) / Н.И. Павлова, Н.П. Филиппова // Потенциал современной науки. – 2015. - № 4 (12). – С. 66-70.

62. Панин, В.А. Оценка генотипа по генам *CSN3* и *LGB*, влияющим на синтез молочного белка и жира в молоке симментальских коров / В.А. Панин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2020. – № 1 (81). – С. 197-201.

63. Петров, А.Н. Производство молочных консервов: инновации в формировании свойств сырья / А.Н. Петров, И.А. Радаева, А.Г. Галстян, С.Н. Туровская // Молочная промышленность. – 2010. – № 5. – С. 74-77.

64. Позднякова, В.Ф. Термоустойчивость сырого молока / В.Ф. Позднякова, П.О. Щеголев, И.В. Карасева // Молочная промышленность. – 2009. – № 8. – С. 80.

65. Полянский, К.К. Предварительная кристаллизация лактозы при сушке сыворотки / К.К. Полянский // Переработка молока. – 2017. – № 8 (214). – С. 24-25.

66. Приказ Министерства здравоохранений РФ от 19 августа 2016 г. № 614 «Об утверждении Рекомендаций по рациональным нормам потребления пищевых продуктов, отвечающих современным требованиям здорового питания».

67. Производство молока в России за последние 10 лет увеличилось на 1 млн тонн [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.dairynews.ru/news/proizvodstvo-moloka-v-rossii-za-poslednie-10-let-u.html.

68. Просеков, А.Ю. Методы определения восстановленного молока в питьевом / А.Ю. Просеков, Е.В. Короткая, О.В. Мудрикова // Молочная промышленность. – 2010. – № 2. – С. 49-50.

69. Радаева, И.А. Выявление фальсификации молочных консервов: научно-правовая база / И.А. Радаева, С.Н. Туровская // Молочная промышленность. – 2013. – № 8. – С. 12-14.

70. Радаева, И.А. К вопросу зависимости эффективности процесса гидратации сухого молока от качества пищевой воды / И.А. Радаева, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, В.К. Семипятный, А.Е. Рябова // Переработка молока. – 2019. – № 10 (240). – С. 62-65. DOI: 10.33465/2222-5455-2019-10-62-65

71. Радаева, И.А. Принципы обеспечения качества отечественного сухого молока / И.А. Радаева, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, А.Е. Рябова, А.Г. Галстян // Пищевая промышленность. – 2019. – № 9. – С. 54-57.

72. Радаева, И.А. Технология молочных консервов и заменителей цельного молока / И.А. Радаева, В.С. Гордезиани, С.П. Шулькина. – Москва: Агропромиздат, 1986. – 351 с.

73. Радаева, И.А. Требования к сухому молоку для производства продуктов детского питания / И.А. Радаева, Е.Е. Илларионова, С.Н. Туровская, В.К. Семипятный // Молочная промышленность. – 2018. – № 5. – С. 53-55.

74. Радаева, И.А. Формирование технологических свойств сухого молока / И.А. Радаева, А.Г. Кручинин, С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, А.В. Бигаева //

Вестник МГТУ. – 2020. – Т. 23 (3). – С.280-290. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-280-290

75. Ракина, Ю.А. Взаимосвязь полиморфизма генов альфа-лактальбумина и бета-лактоглобулина коров с продуктивностью и технологическими свойствами молока: дис. … канд. с.-х. наук : 06.02.07 / Юлия Александровна Ракина. – Уфа, 2013. – 115 с.

76. Российский статистический ежегодник : стат. сб. / Гос. ком. Рос. Федерации по статистике (Госкомстат России). М. : Гос. ком. Рос. Федерации по статистике, 2019. 708 с.

77. Сафин, З.З. Белковый состав, технологические свойства и качество молочной продукции при включении природных минеральных добавок в рационы для дойных коров: дис. … канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Замил Завалович Сафин. – Казань, 2009. – 131 с.

78. Свириденко, Г.М. Методы определения способности молока к сычужному свертыванию / Г.М. Свириденко, М.Б. Захарова // Сыроделие и маслоделие. – 2012. – № 1. – С. 18-19.

79. Свириденко, Ю.Я. Научное обеспечение производства конкурентоспособных продуктов маслоделия и сыроделия / Ю.Я. Свириденко // Сыроделие и маслоделие. – 2014. – № 4. – С. 7-9.

80. Семипятный, В.К. Совершенствование процесса растворения сухого молока: математическое моделирование системы "твердая частица – жидкость" / В.К. Семипятный, М.Н. Стрижко, А.Г. Галстян // Молочная промышленность. – 2013. – № 8. – С. 28-30.

81. Семипятный, В.К. Совершенствование процесса растворения сухого молока: математическое моделирование системы "множество частиц – жидкость" / В.К. Семипятный, М.Н. Стрижко, А.Г. Галстян // Молочная промышленность. – 2013. – № 12. – С. 36-37.

82. Союзмолоко: Потребление молочной продукции в 2020 году увеличилось на 800 тыс. т [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://milknews.ru/index/moloko/potreblenie-molochnaya-produkciya-2020.html.

83. Справочник Tetra Pak «Технология производства молочных продуктов» [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/ru/chapter/cblp.

84. Стрижко, М.Н. К вопросу о рациональности процесса восстановления сухих молочных продуктов / М.Н. Стрижко, В.К. Семипятный, И.А. Радаева, [и др.] // Молочная промышленность. – 2014. – № 6. – С. 63-66.

85. Сулимова, Г.Е. Аллельный полиморфизм гена каппа-казеина (*CSN3*) у российских пород крупного рогатого скота и его информативность как генетического маркера / Г.Е. Сулимова, М. Ахани Азари, Д. Ростамзадех, [и др.] // Генетика. – 2007. – Т. 43 (1). – С. 88-95.

86. Тельнов, Н.О. Влияние генотипа каппа-казеина на молочную продуктивность и технологические свойства молока коров красно-пестрой породы в Республике Мордовия / Н.О. Тельнов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2016 – №2 (34). – С. 160-163.

87. Тепел, А. Химия и физика молока/ А. Тепел.–М.: Профессия, 2012.–832 с.

88. Тихомирова, Н.А. Определение размера коллоидных белков молока методом динамического рассеяния света / Н.А. Тихомирова, А.Д. Левин, М.К. Аленичев, И.Е. Жованник // Молочная промышленность. – 2017. – № 10. – С. 72-73.

89. Тихомирова, Н.А. Технология и организация производства молока и молочных продуктов / Н.А. Тихомирова. – М.: ДеЛи принт, 2007. – 560 с.

90. Трофимова, Е.А. Состав и технологические свойства молока черно-пестро-голштинских помесных коров в условиях Красноярского края: дис. ... канд. с.-х. наук : 06.02.04 / Елена Александровна Трофимова. – Красноярск, 2007. – 151с.

91. Туровская, С.Н. Безопасность молочных консервов как интегральный критерий эффективности их технологии. Российский опыт / С.Н. Туровская, А.Г. Галстян, А.Н. Петров // Пищевые системы. – 2018. – Т. 1 (2). – С. 29-54. DOI: 10.21323/2618–9771–2018–1–2–29–54

92. Туровская, С.Н. Молочные консервы: эволюция продуктов и стандартов / С.Н. Туровская, Е.Е. Илларионова, С.А. Хуршудян, И.А. Радаева // Контроль качества продукции. – 2019. – № 7. – С. 53-56.

93. Тюлькин, С.В. Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний : дис. … докт. биол. наук : 06.02.07 / Тюлькин Сергей Владимирович. – Казань, 2019. – 349 с.

94. Тюлькин, С.В. Полиморфизм гена каппа-казеина в стадах крупного рогатого скота Республики Татарстан / С.В. Тюлькин, Т.М. Ахметов, Л.Р. Загидуллин, [и др.] // Ученые записки Казанской ГАВМ. – 2016. – Т. 225 (1). – С. 148-151.

95. Тюлькин, С.В. Способ проведения ПЦР в реальном времени для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *K* гена *DGAT1*. Патент на изобретение РФ № 2619167 / С.В. Тюлькин, Р.Р. Вафин, Т.М. Ахметов, [и др.] // Официальный бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – опубликовано 12.05.2017. – Бюл. № 14.

96. Фролов, Г.А. Системы водоподготовки в производстве восстановленных молочных продуктов / Г.А. Фролов, А.Г. Галстян, А.Н. Петров // Пищевая промышленность. – 2008. – № 3. – С. 42-43.

97. Фролов, Г.А. Теоретические основы растворения сухих молочных продуктов в воде / Г.А. Фролов, А.Г. Галстян, А.Н. Петров // Молочная промышленность. – 2008. – № 1. – С. 84-85.

98. Хаертдинов, Р.А. Белки молока / Р.А. Хаертдинов, М.П. Афанасьев, Р.Р. Хаертдинов. – Казань: Изд. «Идел-Пресс». – 2009. – 256 с.

99. Хаертдинов, Р.А. Селекция на повышение белковости и улучшение технологических свойств молока / Р.А. Хаертдинов, А.М. Гатауллин. – Казань, 2000. – 132 с.

100. Харитонов, В.Д. Экспериментальные образцы оборудования для отработки технологических процессов в пищевой промышленности / В.Д. Харитонов, [и др.] // Пищевая промышленность. – 2010. – № 10. – С. 14-16.

101. Шайдуллин, Р.Р. Оценка полиморфизма гена каппа-казеина у животных черно-пестрой породы / Р.Р. Шайдуллин, А.С. Ганиев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3 (31). – С. 104-109.

102. Шайдуллин, Р.Р. Сыропригодность молока черно-пестрых коров с разными генотипами каппа-казеина и диацилглицерол 0-ацилтрансферазы / Р.Р. Шайдуллин, Г.С. Шарафутдинов, А.Б. Москвичева // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. - № 2. – С. 59-63.

103. Шувариков, А.С. Использование генетических и паратипических факторов в повышении продуктивности и качества молока коров: дис. … д-ра с.-х. наук : 06.02.04, 06.02.01/Анатолий Семенович Шувариков. – Москва, 2004. – 292 с.

104. Юрова, Е.А. Оценка жировой фазы молочной продукции. Влияние технологических факторов и времени хранения на жирно-кислотный состав / Е.А. Юрова, Н.А. Жижин // Молочная промышленность. – 2016. – № 12. – С. 36-38.

105. Ярлыков, Н.Г. Влияние генотипа каппа-казеина на молочную продуктивность и сыропригодность молока коров ярославской породы: дис… канд. с.-х. наук : 06.02.07 / Николай Геннадьевич Ярлыков. – Ярославль, 2010. – 125 с.

106. Akkerman, M. Relationship between casein micelle size, protein composition and stability of UHT milk / M. Akkerman, L.B. Johansen, V. Rauh [et al.] // International Dairy Journal. – 2021. – V. 112, N 104856. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104856

107. Alexander, L.J. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene / L.J. Alexander, A.F. Stewart, A.G. Mackinlay, [et al] // European Journal of Biochemistry. – 1988. – Vol. 178, N 2. – P. 395-401. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14463.x

108. Alim, M.A. Effect of polymorphisms in the CSN3 (κ-casein) gene on milk production traits in Chinese Holstein Cattle / M. A. Alim, T. Dong, Y. Xie, [et al.] // Molecular Biology Reports. – 2014. – Vol. 41, N 11. – P. 7585-7593. DOI: 10.1007/s11033-014-3648-x

109. Amalfitano, N. Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis / N. Amalfitano, C. Cipolat-Gotet, A. Cecchinato, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019. – Vol. 102, N 4. – P. 2903-2917. DOI: 10.3168/jds.2018-15524

110. Baldwin, A. Effects of drying and storage on milk proteins / A. Baldwin, K. Higgs, M. Boland, P. Schuck // Milk Proteins. – 2020. – P. 423-466. DOI: 10.1016/b978-0-12-815251-5.00011-6

111. Barroso, A. Detection of Bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) / A. Barroso, S. Dunner, J. Canon // J. Anim. Sci. – 1998. – V. 76. – №. 6. – P. 1535-1538.

112. Bijl, E. Posttranslational modifications of caseins / E. Bijl, J.W. Holland, M. Boland // Milk Proteins. – Academic Press, 2020 – P. 173-211.

113. Bonfatti, V. Effect of k-casein B relative content in bulk milk k-casein on Montasio, Asiago, and Caciotta cheese yield using milk of similar protein composition / V. Bonfatti, A. Cecchinato, G. Di Martino, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2011. – V. 94. – P. 602-613. DOI: 10.3168/jds.2010-3368

114. Chasovshchikova, M.A. Relationship between the genetic variants of kappa-casein and prolactin and the productive-biological characteristics of cows of the black-motley breed / M.A. Chasovshchikova, O.M. Sheveleva, M.A. Svjazhenina, [et al.] // Journal of pharmaceutical sciences and research. – 2017. – Vol 9, N 7. – P. 1038-1044.

115. Chavan, R.S. UHT Milk Processing and Effect of Plasmin Activity on Shelf Life: A Review / R.S. Chavan, S.R. Chavan, C.D. Khedkar, [et al.] // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol. 10. – P. 251. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x

116. Čítek, J. Gene polymorphisms influencing on yield, composition and technological properties of milk from Czech Simmental and Holstein cows / J. Čítek, M. Brzakova, L. Hanusova, [et al.] // Animal Bioscience. – 2021. – Vol. 34, N 1. – P. 2-11. DOI: 10.5713/ajas.19.0520

117. Comin, A. Effects of composite beta- and kappa-casein genotypes on milk coagulation, quality and yield traits in Italian Holstein cows / A. Comin, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2008. – Vol. 91, N 10. – P. 4022-4027. DOI: 10.3168/jds.2007-0546

118. Crowley, S.V. Heat stability of reconstituted milk protein concentrate powders / S.V. Crowley, M. Megemont, I. Gazi, [et al.] // International Dairy Journal. – 2014. – Vol. 37, N 2. – P. 104-110. DOI: 10.1016/j.idairyj.2014.03.005

119. Fan, X. Polymorphisms of the kappa casein (*CSN3*) gene and inference of its variants in water buffalo (*Bubalus bubalis*) / X. Fan, Z. Znang, L. Qui, [et al.] // Archives Animal Breeding. – 2019. – Vol. 62, N 2. – P. 585-596. DOI: 10.5194/aab-62-585-2019

120. Fontanesi, L. Association of 20 candidate gene markers with milk production and composition traits in sires of Reggiana breed, a local dairy cattle population / L. Fontanesi, E. Scotti, A.B. Samorè, [et al.] // Livestock Science. – 2015. – Vol. 176. – P.14-21. DOI: 10.1016/j.livsci.2015.03.022

121. Gaber, S.M. Effect of freezing temperatures and time on mineral balance, particle size, rennet and acid coagulation of casein concentrates produced by microfiltration/ S.M. Gaber [et al.] // International Dairy Journal. – 2020. – Vol. 101, № 104563. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104563

122. Galstyan, A.G. Effects of critical fluctuations of storage temperature on the quality of dry dairy product / A.G. Galstyan, A.N. Petrov, E.E. Illarionova, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019. – Vol. 102, N 12. – P. 10779 – 10789. DOI: 10.3168/jds.2019-17229

123. Galstyan, A.G. Technological additives as an element of dry milk properties directed formation / A.G. Galstyan, S.N. Turovskaya, A.E. Ryabova, [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences. – 2019. – Vol. 4, N 436. – P. 95-102. DOI: 10.32014/2019.2518-170X.102

124. Gurses, M. Polymorphisms of kappa-casein gene and their effects on milk production traits in Holstein, Jersey and Brown Swiss cattle / M. Gurses, H. Yuce, E.O.

Etem, B. Patir // Animal Production Science. – 2018. – Vol. 58, N 5. – P. 778. DOI: 10.1071/an15131

125. Huppertz, T. Heat stability of milk. In: P. McSweeney, J. O'Mahony (Eds.) // Advanced Dairy Chemistry, Springer, NY. – 2016. – P. 179-196. DOI: 10.1007/978-1-4939-2800-2_7

126. Ionel, N. R. Effects of sires genotyping for k-Casein on B allele frequency in Romanian Brown Cattle / N. R. Ionel, D. Ilie, C. L. Toma // Research Journal of Biotechnology. – 2017. – Vol. 12, N 12. – P. 9–13.

127. Kaminski, S. Kappa-casein genotyping of Polish Black-and-White × Holstein-Friesian bulls by polymerase chain reaction / S. Kaminski, I. Figiel // Genetica Polonica. – 1993. – V. 34. – P. 65-72.

128. Katlishin, O.I. Evaluation of competitiveness of top-grades of ultrapasterized milk in the conditions of Covid-19 / O.I. Katlishin // Amazonia Investiga. – 2021. – Vol. 10, N 39. – P. 16-27. DOI: 10.34069/AI/2021.39.03.2

129. Kelly, A.L. Manufacture and Properties of Dairy Powders / A.L. Kelly, P.F. Fox // Advanced Dairy Chemistry. – 2016. – P. 1-33.DOI:10.1007/978-1-4939-2800-2_1

130. Ketto, I.A. Effects of milk protein polymorphism and composition, casein micelle size and salt distribution on the milk coagulation properties in Norwegian Red cattle / I.A. Ketto, T.M. Knutsen, J. Oyaas, [et al.] // International Dairy journal. – 2017. – V. 70. – P. 55-64. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.10.010

131. Khramtsov, A.G. New technological paradigm of the Russian dairy industry: formation principles under globalisation / A.G. Khramtsov // Foods and Raw Materials. – 2019. – Vol. 7, N 2. – P.291-300. DOI: 10.21603/2308-4057-2019-2-291-300

132. Magan, J.B. Physicochemical properties of whole milk powder derived from cows fed pasture or total mixed ration diets / J.B. Magan, J.T. Tobin, T.F. O'Callaghan, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2019. – № 11 (102). – P. 9611-9621. DOI: 10.3168/jds.2019-16415

133. Makarova, N.V. The content of proteins in the milk of cows tatarstan type with their mastitis / N.V. Makarova, R. A. Khaertdinov, I.N. Kamaldinov, [et al.] //

Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. – Vol. 9, N 6. – P. 1202-1209.

134. Matejicek, A. Joint effects of *CSN3* and *LGB* genes on milk quality and coagulation properties in Czech Fleckvieh / A. Matejicek, J. Matejickova, M. Stipkova, [et al.] // Chech Journal of Animal Science. – 2008. – Vol. 53, N 6. – P. 246-252. DOI: 10.17221/363-CJAS

135. Meier, S. DNA Sequence Variants and Protein Haplotypes of Casein Genes in German Black Pied Cattle (DSN) / S. Meier, P. Korkuć, D. Arends, G.A. Brockmann // Frontiers in Genetics. – Vol. 10. – P. 1129. DOI: 10.3389/fgene.2019.01129

136. Miluchová, M. Association of *Hind*III-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in Holstein cattle / M. Miluchová, M. Gábor, J. Candrák, A. Trakovická, K. Candráková // Acta Biochimica Polonica. – 2018. – Vol. 65, N 3. – P. 403–407. DOI: 10.18388/abp.2017_2313

137. Neamt, R. I. The influence of CSN3 and LGB polymorphisms on milk production and chemical composition in Romanian Simmental cattle / R.I. Neamt, G. Saplacan, S. Acatincai, [et al.] // Acta Biochimica Polonica. – 2017. – Vol. 64, N 3. – P. 493-497. DOI: 10.18388/abp.2016_1454

138. Ng-Kwai-Hang, K.F. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations / K.F. Ng-Kwai-Hang, H.G. Monardes, J.F. Hayes // Journal of Dairy Science. – 1990. – V. 73. – P. 3414-3420.

139. Nikšić, D. Polymorphism of k-casein and β-lactoglobuline in Simmental cattle in Serbia / D. Nikšić, V. Pantelić, D. Ostojić-Andrić, [et al.] // Genetika, 2018. – Vol. 2. – P. 659-668. DOI: 10.2298/GENSR1802659N

140. Ozdemir, M. Relationships between milk protein polymorphisms and production traits in cattle: A systematic review and meta-analysis / M. Ozdemir, S. Kopuzlu, M. Topal, O. Bilgin // Archives Animal Breeding. – 2018. – Vol. 61. – P. 197-206. DOI: 10.5194/aab-61-197-2018

141. Perna, A. The influence of casein haplotype on quality, coagulation, and yield traits of milk from Italian Holstein cows / A. Perna, I. Intaglietta, E. Gambacorta,

A. Simonetti // Journal of Dairy Science. – 2016. – V. 99. – P. 3288-3294. DOI: 10.3168/jds.2015-10463

142. Petrov, A.N. Indicators of Quality of Canned Milk: Russian and International Priorities. A.N. Petrov, A.G. Galstyan, I.A. Radaeva, [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2017. – Vol. 5, N 2. – P. 151-161. DOI: 10.21603/2308-4057-2017-2-151-161

143. Poulsen, N. Novel genetic variation associated to *CSN3* strongly affects rennet-induced milk coagulation / N. Poulsen, V.R. Gregersen, G.M. Maciel, [et al.] // International Dairy Journal. – 2017. – Vol. 71. – P. 122-130. DOI: 10.1016/j.idairyj.2017.03.012

144. Schuck, P. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and behavior / P. Schuck // Dairy-Derived Ingredients. – 2009. – P. 24-50. DOI: 10.1533/9781845697198.1.24

145. Sitkowska, B. Relations between kappa-casein polymorphism (CSN3) and milk performance traits in heifer cows / B. Sitkowska, W. Neja, E. Wiśniewska // Journal of Central European Agriculture. – 2008. –Vol. 9, N 4. – P. 641-644.

146. Soria, L.A. A PCR-RFLP Test to Detect Allelic Variants of the Bovine Kappa-Casein Gene / L.A. Soria, G.M. Iglesias, M.J. Huguet, [et al.] // Animal Biotechnology. – 2003. – Vol. 14, N 1. – P. 1-5.

147. Turovskaya, S.N. Scientific and practical potential of dairy products for special purposes / S.N. Turovskaya, A.G. Galstyan, A.N. Petrov, [et al.] // News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of Geology and Technical Sciences. – 2018. – Vol. 6, N 432. – P. 16-22. DOI: 10.32014/2018.2518-170X.31

148. 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, N 438. – P. 177-183.

149. Tyulkin, S.V. Technological Properties of Milk of Cows with Different Genotypes of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin / S.V. Tyulkin, R.R. Vafin, L.R.

Zagidullin, [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2018. – Vol. 6, N 1. – P. 154-162. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-1-154-162

150. Vallas, M. Composite beta-kappa-casein genotypes and their effect on composition and coagulation of milk from Estonian Holstein cows / M. Vallas, T. Kaart, S. Varv, [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2012. – Vol. 95, N 11. – P. 6760-6769. DOI: 10.3168/jds.2012-5495

151. Yun, S.-Y. Changes in Particle Size, Sedimentation, and Protein Microstructure of Ultra-High-Temperature Skim Milk Considering Plasmin Concentration and Storage Temperature / S.-Y. Yun, J.-Y. Imm // Molecules. – 2021. – Vol. 26, N 2339. DOI: 10.3390/molecules26082339

152. Zambrano Burbano, G.L. Kappa casein genotypes and curd yield in Holstein cows / G.L. Zambrano Burbano, Y.M. Eraso Cabrera, C.E. Solarte Portilla, [et al.] // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2010. – Vol. 23, N 4. – P. 422-428.

Приложение 1

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное научное учреждение
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора ФГАНУ «ВНИМИ»
_____ А.Г. Галстян
« 25 » декабря 2020 г.

МЕТОДИКА СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СООТНОШЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ДОЛЕЙ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА КАППА-КАЗЕИНА В МОЛОКЕ СБОРНОМ

РАЗРАБОТАНО

ФГАНУ «ВНИМИ»

Младший научный сотрудник
лаборатории молочных консервов

_____ А.В. Бигаева
« 25 » декабря 2020 г.

Москва 2020

Приложение 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2021616048

«РАСЧЕТ СООТНОШЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ДОЛЕЙ АЛЛЕЛЕЙ К-КАЗЕИНА В МОЛОКЕ СБОРНОМ»

Правообладатель: ***ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (RU)***

Авторы: ***Бигаева Алана Владиславовна (RU), Семипятный Владислав Константинович (RU), Гильманов Хамид Халимович (RU), Вафин Рамиль Ришадович (RU), Пряничникова Наталия Сергеевна (RU), Туровская Светлана Николаевна (RU), Лазарева Екатерина Германовна (RU)***

Заявка № **2021612661**

Дата поступления **03 марта 2021 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре программ для ЭВМ ***15 апреля 2021 г.***

Руководитель Федеральной службы

по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

Приложение 3

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)
ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ «МОЛОКО»
Аттестат аккредитации RA.RU.21ПЩ98
Зарегистрирован в реестре органов по сертификации и аккредитованных испытательных лабораторий (центров)
115093, г. Москва, ул. Люсиновская д. 35, корп.7
ИНН 7705009252 КПП 770501001
Банковские реквизиты: Получатель УФК по г. Москве (ФГАНУ «ВНИМИ», л/сч 30736Н70560)
(Банк: ГУ Банка России по ЦФО//УФК по г. Москве г. Москва)
БИК 004525988 Казначейский счет: 03214643000000017300
Единый казначейский счет: 40102810545370000003
ОКАТО 45286560000 ОКТМО 45376000 ОКПО 00419785 ОГРН 1037739374672
Телефон: + 7(499) 236-44-81 (лаборатория); Эл. адрес: ilmoloko@mail.ru, il@vnimi.org (лаборатория)

АКТ

Апробации методики системы оценки технологических свойств молока с применением определения соотношения относительных долей аллелей гена $\varkappa$ -казеина в молоке сборном

Мы, нижеподписавшиеся: руководитель испытательной лаборатории «Молоко» (ФГАНУ «ВНИМИ»), к.т.н. Юрова Е.А., научный сотрудник, к.т.н. Жижин Н.А., младший научный сотрудник Бигаева А.В., составили настоящий акт о том, что на базе испытательной лаборатории «Молоко» проведена апробация методики молекулярно-генетической оценки технологических свойств молочного сырья путем определения соотношения относительных долей аллелей гена $\varkappa$-казеина в молоке сборном. Методика разработана во ФГАНУ «ВНИМИ» и утверждена 25.12.2020 г.

Разработанный методологический подход включает в себя экстракцию ДНК из исследуемых образцов, проведение совмещенной техники полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, учет получаемых результатов электрофоретической детекции с применением системы гель-документирования и анализ информационных данных. Для ускорения анализа результатов экспериментального молекулярно-генетического блока разработано программное обеспечение, зарегистрированное в Роспатенте. Получено Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ № 2021616048 от 15.04.2021 г. «Расчет соотношения относительных долей аллелей $\varkappa$-казеина в молоке сборном».

Проведены исследования различных по влажности продуктовых форм сборного молока. Оценка полученных результатов показала, что абсолютная погрешность разработанной методики не превышала 1,75% независимо от вида продукта.

Предлагаемая методика позволит расширить область оценочных критериев качества молока в рамках входного контроля, рационализировать выбор направления переработки, повысить качество выпускаемой продукции. Дополнительно внедрение данной методики в молочной отрасли обеспечит решение задачи прижизненного формирования свойств животноводческого сырья путем интенсификации направленного селекционного отбора в стране.

Е.А. Юрова

Н.А. Жижин

А.В. Бигаева

Приложение 3

Министерство образования и науки Российской Федерации
Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ВНИИТеК – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)
142703, Московская обл., г. Видное, ул. Школьная, д. 78
Телефон: 8-495-541-08-92; факс: 8-495-541-08-92
E-mail: **vniitek@vniitek.ru**

Утверждаю
Директор ВНИИТеК – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН
_____
Петров А. Н.
«__» _____ 2020 г.

АКТ

внедрения в практику лабораторных исследований результатов диссертационной работы Бигаевой А.В. на тему: «Разработка молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств сухого молока в контексте эффективности его переработки»

Мы, нижеподписавшиеся: от ВНИИТеК – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН руководитель Испытательного центра, к.б.н. Самойлов А.В., от ФГАНУ «ВНИМИ» – заведующий лабораторией молочных консервов, к.т.н. Кручинин А.Г., младший научный сотрудник лаборатории молочных консервов Бигаева А.В., составили настоящий акт о том, что на базе лаборатории испытательного центра ВНИИТеК – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» проведена апробация методики системы оценки технологических свойств молока с применением определения соотношения относительных долей аллелей гена каппа-казеина в молоке сборном.

При исследовании образцов молочного сырья подтверждены установленные закономерности формирования функционально-технологических свойств молока, по которым лучшей термоустойчивостью

обладает сборное сырье, в котором преобладает молоко гомозиготных коров с *А* аллельным вариантом гена каппа-казеина, а лучшей сыропригодностью – сборное сырье, в котором превалирует молоко гомозиготных коров с *В* вариантом.

Применение разработанной методики в комплексе с нормированными показателями молочного сырья способствует рационализации его переработки, что повышает эффективность производства в целом.

_____ А.В. Самойлов

_____ А.Г. Кручинин

_____ А.В. Бигаева

Приложение 3

АКТ

апробации разработанной молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств сухого молока в контексте эффективности его переработки

Мы, нижеподписавшиеся: от ПАО МК «Воронежский» начальник отдела технологического контроля и развития, д.т.н. Мельникова Е.И., технолог Коротков В.Г., от ФГАНУ «ВНИМИ» заместитель директора по научной работе, к.т.н. – Пряничникова Н.С., заведующий лабораторией молочных консервов, к.т.н. – Кручинин А.Г., младший научный сотрудник – Бигаева А.В., составили настоящий Акт о том, что в условиях производства ПАО «МК «Воронежский» в период с 07.06.2021 г. по 09.06.2021 г. проведена выработка пробной партии восстановленного стерилизованного молока из сырья, прошедшего молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки технологических свойств.

Исследованию подвергали сухое молоко, отобранное на участке входного контроля. Установлено, что внедрение разработанной методики молекулярно-генетической оценки технологических свойств молока путем определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* в сборном молоке позволило повысить качество продуктов переработки восстановленного молока путем улучшения показателя его термоустойчивости.

Данное решение позволило выработать продукцию, соответствующую требованиям СТО 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия».

На основании результатов опытно-промышленной проверки комиссия считает предложенный способ оценки технологических свойств сухого молока перспективным и рекомендует для применения в производственной практике.

ОГРН 1023601608392 Публичное акционерное общество МОЛОЧНЫЙ КОМБИНАТ «ВОРОНЕЖСКИЙ» Россия • Воронеж

_____/Мельникова Е.И./

_____/Коротков В.Г./

_____/Пряничникова Н.С./

_____/Кручинин А.Г./

_____/Бигаева А.В./

Приложение 3

ИТАЛЬЯНСКИЕ
ТРАДИЦИИ

Общество с ограниченной ответственностью
«Итальянские традиции»
Россия, 115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7А, 2 эт., ком. 20
ИНН 7729660696, КПП 770501001, ОГРН 1107746588113

АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы Бигаевой А.В. по теме: «Разработка молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств сухого молока в контексте эффективности его переработки»

Мы, нижеподписавшиеся: от ООО «Итальянские традиции» заместитель генерального директора Демченко А.Ю., главный технолог Новелли Иван, от ФГАНУ «ВНИМИ» заместитель директора по научной работе, к.т.н. – Пряничникова Н.С., заведующий лабораторией молочных консервов, к.т.н. – Кручинин А.Г., младший научный сотрудник – Бигаева А.В., составили настоящий акт о том, что в условиях производственной площадки компании в период с 01.06.2021 г. по 30.06.2021 г. проведены опытные выработки сыров из сырья, прошедшего молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки технологических свойств.

Исследованию подвергали молоко, отобранное на участке входного контроля. Установлено, что внедрение разработанной методики молекулярно-генетической оценки технологических свойств молока путем определения соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* позволило отобрать на переработку априори сыропригодное сырье. Благодаря чему наблюдалось увеличение выхода продукта стабильно высокого качества при отсутствии потребности в использовании дополнительного оборудования или процессов на производстве.

На основании результатов опытно-промышленной проверки комиссия считает предложенный способ оценки технологических свойств молочного сырья перспективным и рекомендует для применения в производственной практике.

"Итальянские традиции"

_____ /Демченко А.Ю./
_____ /Новелли Иван/
_____ /Пряничникова Н.С./
_____ /Кручинин А.Г./
_____ /Бигаева А.В./

Приложение 3

НОВАЯ ИЗИДА ТМ

ООО «НОВАЯ ИЗИДА»
ИНН 5823901465 / КПП 582301001
Адрес местонахождения: 442370, Пензенская обл., Мокшанский р-он, р.п. Мокшан, ул. Энгельса, д. 8
Телефон 984-25-83, 780-41-04, E-mail: 999.2004@mail.ru

Банковские реквизиты:
Банк: АКБ «АБСОЛЮТ БАНК» (ПАО)
БИК 044525976
Расчетный счет 40702810424000003492
Корреспондентский счет
30101810500000000976

Исх. _____ от 13.07.2021 г.

По месту требования

АКТ

о внедрении научно-исследовательской работы

ООО «НОВАЯ ИЗИДА» сообщает, что в период с 30.04.2021 г. по 09.07.2021 г. на производстве были выработаны опытные партии продукции из молочного сырья, прошедшего комплексную систему оценки с расширенными критериями качества, разработанную в рамках выполнения диссертационной работы по теме «Разработка молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств сухого молока в контексте эффективности его переработки» Бигаевой А.В.

При участии Бигаевой А.В. были идентифицированы функционально-технологические свойства сырья – термоустойчивость и сыропригодность по молекулярно-генетическим показателям, что позволило ранжировать сырье по оптимальному направлению переработки.

Сухое молоко, с доминированием ДНК-маркера сыропригодности (аллель *B* гена *CSN3*), было использовано в производстве йогуртов. При этом получаемый продукт характеризовался плотной, однородной структурой. Сухое молоко, признанное по результатам оценки доминирующего аллельного варианта гена *CSN3* термоустойчивым, направлялось на производство ультрапастеризованного молока. Данное решение позволило выработать продукцию, соответствующую требованиям СТО 00419785-054-2021 «Молоко восстановленное из сухого молока стерилизованное. Технические условия».

Генеральный директор _____ А.В. Мазуров

Приложение 3

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

ВНИМИ

СТАНДАРТ ФГАНУ «ВНИМИ» | СТО ВНИМИ 00419785-054-2021

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГАНУ «ВНИМИ»
_____А.Г. Галстян
«01» июня 2021 г.

МОЛОКО ВОССТАНОВЛЕННОЕ ИЗ СУХОГО МОЛОКА СТЕРИЛИЗОВАННОЕ

Технические условия

РАЗРАБОТАНО

ФГАНУ «ВНИМИ»

Заведующий лабораторией молочных консервов
_____А.Г. Кручинин
«01» июня 2021 г.

Младший научный сотрудник лаборатории молочных консервов
_____А.В. Бигаева
«01» июня 2021 г.

Москва
2021

Приложение 4

ФНЦ ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМ. В.М. ГОРБАТОВА РАН

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ

Бигаева Алана Владиславовна

Лауреат конкурса на лучшую
научно-исследовательскую работу в рамках

XIII международной
научно-практической конференции
молодых учёных и специалистов

**«Перспективные исследования
и новые подходы к производству
и переработке сельскохозяйственного сырья
и продуктов питания»**

Директор
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН, д.т.н. О.А. Кузнецова

ВНИИМС - филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
29-30 октября 2019 г.
Углич

Приложение 5

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, № 438. – 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. – С. 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. – № 6. – С. 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. – С. 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 к-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 каппа-казеина 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. – С. 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. – С. 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. – С. 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 ϰ-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.