

Радаева Искра Александровна, гл.н.с., д.т.н., профессор,

Кручинин Александр Геннадьевич, зав.лаб., к.т.н.,

Туровская Светлана Николаевна, с.н.с.,

Бигаева Алана Владиславовна, м.н.с.,

Илларионова Елена Евгеньевна, н.с.

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (Россия, г.Москва)

КОМПЛЕКСНЫЙ МОНИТОРИНГ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУХОГО МОЛОКА КАК ОСНОВА ДЛЯ БИОИНФОРМАЦИОННОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Аннотация. В статье представлен экспериментальный алгоритм выполнения работ по одному из направлений многоаспектных изысканий в рамках разработки молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки технологических свойств сухого молока, заключающийся в осуществлении комплексного мониторинга молочного сырья по наиболее важным технологическим критериям и соотносению полученных данных с характеристиками ассоциированных генов. Приведена и подробно описана схема поэтапных исследований, обеспечивающих системный подход к определению соотношения относительных долей аллелей генов белков в сухом молоке и выявлению их корреляции с технологическими свойствами по совокупности проводимых испытаний.

Ключевые слова: сухое молоко, термоустойчивость, сыропригодность, каппа-казеин (CSN3), генотипирование.

Radaeva Iskra Alexandrovna, principal research officer, D.E., professor,

Kruchinin Alexandr Gennadevich, Laboratory chef, Ph.D.,

Turovskaya Svetlana Nikolaevna, senior researcher,

Bigaeva Alana Vladislavovna, research assistant,

Illarionova Elena Evgenevna, research officer

All-Russian Dairy Research Institute (Russia, Moscow)

COMPLEX MONITORING OF DRY MILK TECHNOLOGICAL PROPERTIES FOR BIOINFORMATIONAL MODELLING

Abstract. The experimental algorithm of the works executed according to one of the trends of multifold investigations in the frame of the development of molecular-genetic and bioinformational system of evaluation of dry milk technological properties consisting in realization of milk raw material complex monitoring by the most important technological criteria and correlation of the obtained data with the associated genes characteristics has been presented in the article. The article

presents and gives the detailed description of diagram of stepwise investigations providing systematic approach to the determination of the correlation of relative alalia parts of protein genes in dry milk and revealing their correlation with technological properties by the set of the executed tests.

Key words: dry milk, heat stability, cheese aptitude, kappa-casein (CSN3), genetic typing.

Производство высококачественных пищевых продуктов обусловлено, прежде всего, параметрами сырья, соответствующими требованиям нормативно-технической документации по качеству и безопасности, а также обладающими определенными технологическими свойствами [1].

Именно поэтому для удовлетворения потребностей рынка в широко представленном ассортименте молочной продукции, необходимы сырьевые составляющие с определенными качественными показателями, как, например, фракционный состав белков, отрегулированный в соответствии с потребностями конкретного производства по сыропригодности или, напротив, термоустойчивости [2].

В то же время совокупность физико-химических, органолептических характеристик молока-сырья и количественного соотношения в нём технологически значимых групп веществ, представленных белковой, жировой и углеводной компонентами и оказывающих влияние на технологические свойства, преимущественно определяют паратипические и генетические факторы [3].

Многочисленными исследованиями, направленными на повышение экономической эффективности молочного животноводства, установлена зависимость качественных показателей молочного сырья от сезона года, периода лактации, условий содержания, кормового рациона и состояния здоровья животных. Однако наряду с этим доказано, что прижизненное формирование устойчивости молока к тепловому воздействию и его сыропригодность обусловлены, по большей части, наследственностью, которая и определяет породные, линейные, а также генотипические различия по данным свойствам [4,5].

Анализ существующей взаимосвязи сформировал потребность выявления и использования определенных технологических свойств молока, наиболее значимых для конкретных направлений молочной отрасли, обуславливая возникновение селекционных работ по установлению генетических маркеров, ассоциированных с качественными признаками молочной продуктивности. Значительный интерес в этом аспекте представляют такие фракции молочного белка, как α 1-казеин, β -казеин, β -лактоглобулин и один из наиболее изучаемых на сегодняшний день – κ -казеин [6]. Тестирование биоматериала и/или молочного сырья по локусу гена каппа-казеина (CSN3) является особенно актуальным с позиции доказанности достоверной связи превалирования аллельных вариантов (CSN3) с технологическими показателями молока [7].

Широкое распространение методов молекулярной диагностики, основанных на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) инициировало появление целого направления исследований, позволяющих определять частоту встречаемости аллельных вариантов и генотипов κ -казеина не только в выборках биоматериала от отдельных лактирующих животных, но также в получаемом молоке, в том числе, прошедшем технологическую обработку [8,9].

Преимущества метода ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) открывают новые перспективы для специалистов молочной отрасли в области сыроделия и молочного консервирования, а особую актуальность приобретает разработка системы оценки технологических свойств сухого молока, на основе современных молекулярно-генетических методов, с возможностью прогнозирования сферы его применения [10].

Термоустойчивость белковых фракций является определяющим критерием в процессе высокотемпературного воздействия при обработке сырья, регламентированного в молочном консервировании, производстве продуктов длительного хранения и детского питания, в то время как способность к сычужной коагуляции – важный качественный показатель, характеризующий его сыропригодность [11].

В молекулярно-генетическом аспекте диагностики данные технологические свойства, как правило, признают несовместимыми признаками с позиции селекционирования. Так исследованиями целого ряда авторов установлено положительное влияние на термоустойчивость аллельного варианта А κ -казеина, тогда как наилучшая сычужная свертываемость обеспечивается присутствием В-аллеля (*CSN3*) [7-9,12].

С учетом накопленного научного материала, а также в рамках исследований, необходимых при разработке молекулярно-генетической и биоинформационной концепции по оценке технологических свойств сухого молока, Лабораторией молочных консервов ФГАНУ «ВНИМИ» сформирован и опробован экспериментальный алгоритм, используемый для обеспечения системного подхода по определению в сухом молоке соотношения относительных долей аллелей генов белковых фракций и выявления их корреляции с технологическими свойствами по совокупности комплексно проводимых испытаний (рисунок).

В соответствии с разработанной комплексной схемой на первом этапе исследования проводят оценку полиморфизма молочных белков методом ПЦР-ПДРФ диагностики, состоящим из следующих этапов:

1. Пробоподготовка образца, заключающаяся в экстракции ДНК из пробы сухого молока с максимальной очисткой от сопутствующих примесей с применением комбинированного щелочного способа [13,14];

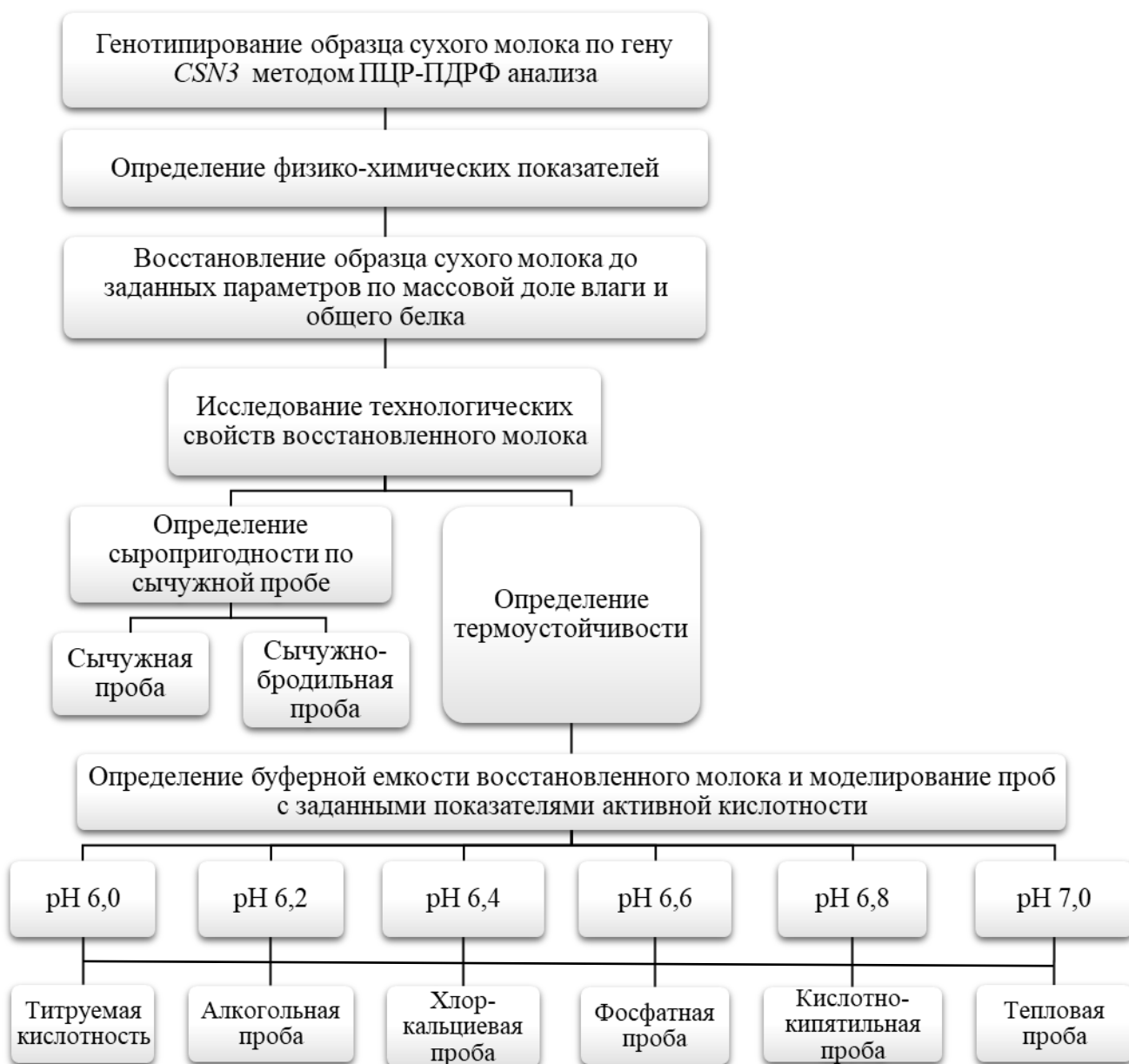


Рисунок – Комплексная схема исследования сухого молока

2. Проведение ПЦР-ПДРФ анализа, путем многократного увеличения (амплификации) участка исследуемого гена, включающего сайт узнавания используемой эндонуклеазы рестрикции, с последующим «разрезанием» полученных участков на фрагменты, по величине которых и проводится детекция присутствия или отсутствия искомым аллелей гена [13,14];

3. Детекция полученных результатов посредством горизонтального электрофореза на агарозном или полиакриламидном геле с применением специального красителя ДНК для визуализации результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе с последующим их анализом.

По окончании аллельной идентификации исследуемое сухое молоко с известным генотипом каппа-казеина и/или других ассоциированных генов, изучают посредством общепринятых в химико-технологическом контроле молочных продуктов методов исследований по показателям, характеризующим

общее количество и соотношение белковых фракций, содержание жира, лактозы, сухих веществ и микроэлементов [15]. Расширенный физико-химический анализ необходим для корректировки навески продукта при последующем его восстановлении с целью получения вариантного ряда гидратированного молока, смоделированного по массовой доле протеиновой фазы или сухих веществ в зависимости от цели исследования, а также для сопоставимости результатов эксперимента в процессе интерпретации.

Восстановление (гидратацию) образца проводят дистиллированной кипяченой водой с рН ($6,5 \pm 0,1$) в соответствии произведенным расчетам по экспериментально заданным параметрам с использованием магнитного лабораторного перемешивающего устройства при скорости 500об/мин и температуре (40 ± 2) °С с выдержкой в течение 15 минут и последующим охлаждением до температуры (20 ± 2) °С, после чего исследуют основные технологические свойства восстановленного продукта – сыропригодность и термоустойчивость.

Принимая во внимание, что основным показателем пригодности молока в сыроделии является его способность к свертыванию под действием сычужного фермента с образованием сгустка определенной плотности, пробу на скорость свертывания с последующей оценкой полученного сгустка или сычужную пробу, следует считать одним из главных методов определения сыропригодности молока, прошедшего предварительную температурную обработку. После визуальной оценки полученного сгустка молоко относят к одному из 3-х классов: хорошее, удовлетворительное и неудовлетворительное.

Наряду с сычужной пробой пригодность сырого молока, характеризующуюся нормальным составом полезной молочнокислой микрофлоры, устанавливают посредством сычужно-бродильной пробы.

Сычужно-бродильная проба основана на способности сырого молока к свертыванию под воздействием сычужного фермента и молочных микроорганизмов, что позволяет оценить качество сычужного сгустка по его плотности и структуре, а также отсутствию нежелательного газообразования [16]. По результатам визуальной оценки молоко также относят к одному из трех классов: хорошее, удовлетворительное и плохое.

Пригодным для выработки сыра считают молоко I или II классов, образующее прочный, эластичный сгусток с нормальным отделением сыворотки (синерезис) при добавлении сычужного фермента. Молоко, которое не свертывается и/или не образует нормальный сгусток, непригодно для сыроделия.

По окончании процесса сычужной коагуляции и осмотра полученного сгустка отделившуюся сыворотку фильтруют через лавсановую ткань, перемешивают и определяют в ней массовую долю белка для установления процентного соотношения перехода общего белка в сыворотку. По совокупности полученных данных производят оценку сыропригодности образца.

После отбора исследуемого молока для установления качества сычужного свертывания, проводят ряд испытаний по определению термоустойчивости. С целью нивелирования возможного влияния на стойкость к нагреванию несхожих показателей активной или титруемой кислотности у разных экземпляров сухого молока, в изучаемой пробе проводят определение буферной емкости по кислоте и щелочи [16], после чего осуществляют

моделирование ряда образцов для испытаний с заданными показателями по активной кислотности в диапазоне от рН 6,0 до рН 7,0 и шагом рН – 0,2. В каждом из модельных образцов измеряют также и титруемую кислотность для соотнесения с показателями рН и последующими результатами проб на термостойкость.

Вследствие того, что механизм процесса тепловой коагуляции молочных белков до настоящего времени полностью не установлен, а стабильность молока при нагревании характеризуется не только одним показателем его физико-химического состояния, а совокупностью ряда факторов, таких как активная кислотность, концентрация свободных ионов кальция, магния, фосфора, цитратов, содержание общего белка и отдельных белковых фракций, степень гидратации белков и пр., на сегодняшний день отсутствует и единый метод определения термоустойчивости, который мог бы учесть все нюансы изменчивости системы в целом. Поэтому в проводимом исследовании использованы различные методы, между которыми не выявлено определенного соответствия или корреляции [17,18], однако их комплексное применение позволяет наиболее полно охарактеризовать способность молока к термоустойчивости.

Алкогольная проба основана на выявлении коагуляции белков молока под действием этилового спирта различных концентраций в течение определенного времени. При смешивании равных объемов молока и спирта нетермостойкое молоко свертывается частично или полностью, а термоустойчивое не изменяется. Определение осуществляют в соответствии с ГОСТ 25228-82 «Молоко и сливки. Метод определения термоустойчивости по алкогольной пробе» применительно к восстановленным сухим молочным объектам. Метод в модификации ВНИМИ предусматривает применение линейки спиртовых растворов с концентрацией 68 %, 70 %, 72 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % и 95 % для расширения диапазона измерений с учетом градации рН модельного ряда образцов.

Хлоркалийевая и фосфатная пробы характеризуют устойчивость молока при нагревании в зависимости от его солевого состава, поскольку существует равновесное соотношение между содержанием солей кальция и магния, с одной стороны и лимонной и фосфорной кислот с другой. Избыточное содержание CaCl_2 или KH_2PO_4 , добавленных к испытуемому молоку, нарушает солевой баланс, поэтому после выдержки проб в кипящей водяной бане оценивают стабильность их белковых фракций к температурному воздействию в течение конкретного временного интервала. Видимая коагуляция белка от едва заметных до выраженных хлопьев свидетельствует о пониженной стабильности молока [16].

В кислотно-кипятильной пробе в качестве фактора влияния на белок молока используют сочетание теплового воздействия и соляной кислоты, ранжируя ее по объему от 0,5 мл до 1,2 мл. Уровень стабильности белковой фракции характеризуется количеством добавленной кислоты. Чем больше внесённой кислоты способен выдержать образец без коагуляции, тем выше его термоустойчивость [17].

Тепловая проба устанавливает продолжительность коагуляции белков в пробах молока, помещенных в глицериновую баню (ультратермостат) при температуре 130-140 °С. Термоустойчивость по тепловой пробе определяют посредством сравнительного анализа способности восстановленных молочных систем выдерживать термическую обработку в течение как можно более

длительного времени. Образцы находятся в ультратермостате до начала коагуляции протеиновой фракции молока, которое фиксируют визуально. По длительности выдержки проводят сравнительную оценку термоустойчивости восстановленных объектов [16,17].

Следует отметить, что тепловая проба является наиболее надежным и объективным методом, обладающим большой чувствительностью и достоверностью результатов. Обеспечивая возможность непосредственного измерения стабильности белков молока под воздействием высоких температур без учета влияния добавляемых денатурирующих веществ, тепловая проба может быть применима в качестве арбитражного метода.

По окончании проведения заданного блока исследований полученные результаты оформляют в форме сводной таблицы для их последующей интерпретации с возможностью математической обработки и программного моделирования.

Выводы. Проведение комплексной оценки молочного сырья по наиболее важным технологическим критериям и соотнесение экспериментальных данных с его генотипическими характеристиками по одному или нескольким ассоциированным генам является неотъемлемой частью построения системы мониторинга технологических свойств сухого молока на основе современных молекулярно-генетических методов с возможностью прогнозирования области его переработки. Разработанный экспериментальный блок предоставляет широкие возможности по накоплению материалов, достаточных для последующего создания биоинформационных алгоритмов математического моделирования оценочных критериев уровня соответствия технологических свойств молочного сырья и продуктов его переработки рекомендуемым показателям по сычужной свертываемости и термоустойчивости.

Список литературы

1. Galstyan A.G., Aksenova L.M., Lisitsyn A.B., Oganesyants L.A., Petrov A.N. Modern approaches to storage and effective processing of agricultural products for obtaining high quality food products // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2019. Т. 89. № 2. С. 211-213.
2. Юрова Е.А., Мельденберг Д.Н., Парфенова Е.Ю. Критерии оценки молока-сырья для получения продукта гарантированного качества // Молочная промышленность. 2019. № 4. С. 26-29.
3. Oganesyants L., Vafin R., Galstyan A., Ryabova A., Khurshudyan S., Semipyatniy V. DNA authentication of brewery products: basic principles and methodological approaches // Foods and Raw Materials. 2019. Т. 7. № 2. С. 364-374.
4. Бигаева А.В., Гильманов Х.Х., Тюлькин С.В., Вафин Р.Р., Галстян А.Г. Термоустойчивость молока коров с разными генотипами каппа-казеина // Пищевая промышленность. 2019. № 10. С. 59-61. DOI: <https://doi.org/10.24411/0235-2486-2019-10159>.
5. Бигаева А.В., Гильманов Х.Х., Тюлькин С.В., Вафин Р.Р., Галстян А.Г. Сыропригодность молока коров с разными генотипами каппа-казеина // Сыроделие и маслоделие. 2019. № 6. С. 26-27.
6. Тюлькин С.В., Ахметов Т.М., Загидуллин Л.Р., Рачкова Е.Н., Шайдуллин С.Ф., Гильманов Х.Х. Полиморфизм гена каппа-казеина в стадах крупного рогатого скота республики Татарстан // Ученые записки Казанской

государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2016. Т.225. № 1. С. 148-151.

7. Тюлькин С.В. Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний: дис. ... доктора биол. наук. Казань, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. 2019. – 349 с.

8. Михайлова Ю.А. Белковомолочность и технологические свойства молока коров с разными генотипами каппа-казеина: дис. ... кандидата с.-х. наук. Ярославль, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославская государственная сельскохозяйственная академия». 2016. – 131 с.

9. Валитов Ф.Р. Эффективность использования современных методов маркерной селекции в молочном скотоводстве: дис. ... доктора с.-х. наук. Уфа, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный аграрный университет». 2018. – 395 с.

10. Башаева Д.В. Термостойчивость коровьего молока, ее генетическая и паратипическая изменчивость: автореф. дис. ... канд. техн. наук. Казань, КГАВМ имени Н.Э.Баумана. 2010. – 23 с.

11. Petrov A.N., Galstyan A.G., Radaeva I.A., Turovskaya S.N., Illarionova E.E., Semiryatniy V.K. et al. Indicators of quality of canned milk: Russian and international priorities // Food and Raw Materials. 2017. Vol. 5 №2. P. 151-161. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2017-2-151-161>.

12. Comin A. et al. Effects of composite β -and κ -casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows // Journal of dairy science. 2008. Т. 91. №10. С. 4022-4027.

13. Вафин Р.Р., Ахметов Т.М., Валиуллина Э.Ф., Зарипов О.Г., Тюлькин С.В. Оптимизация способов генотипирования крупного рогатого скота по гену каппа-казеина // Ветеринарная практика. 2007. № 2 (37). С. 54-69.

14. Тюлькин С.В., Вафин Р.Р., Муратова А.В., Хатыпов И.И., Загидуллин Л.Р., Рачкова Е.Н. и др. Разработка способа проведения ПЦР-ПДРФ на примере DGAT1-гена крупного рогатого скота // Фундаментальные исследования. 2015. № 2 (17). С. 3773-3775.

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

16. Инихов Г.С., Брио Н.П. Методы анализа молока и молочных продуктов. М: Пищевая промышленность, 1971. 423 с.

17. Аристова В.П., Костыгов Л.В., Кутибашвили М.А., Россихина Г.А., Щедушнов Д.Е. Современные представления о термостойкости молока и ее изменения под влиянием различных факторов: Обзорная информация. М: АгроНИИТЭИММП, 1986. 32 с.

18. Magan J.B., Tobin J.T., O'Callaghan T.F., Kelly A.L., Fenelon M.A., Hennessy D., McCarthy N.A. Physicochemical properties of whole milk powder derived from cows fed pasture or total mixed ration diets // Journal of Dairy Science. 2019. №11(102) С. 9611-9621. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16415> (in Eng.).