

Разработка способа определения в сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина

Х. Х. Гильманов*^{ORCID}, В. К. Семипятный^{ORCID}, А. В. Бигаева^{ORCID},
Р. Р. Вафин^{ORCID}, С. Н. Туровская^{ORCID}



ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
молочной промышленности»,
115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35

Дата поступления в редакцию: 13.08.2020
Дата принятия в печать: 25.09.2020

*e-mail: gilmanov.xx@mail.ru



© Х. Х. Гильманов, В. К. Семипятный, А. В. Бигаева, Р. Р. Вафин, С. Н. Туровская, 2020

Аннотация.

Введение. К молоку как к сырью для выработки ассортиментного разнообразия молочных продуктов предъявляются высокие требования в части биологической безопасности и соответствия его физико-химических и технологических свойств регламентируемым показателям. Целью настоящей работы являлась разработка способа определения соотношения относительных долей аллелей селекционно-значимого гена κ -казеина крупного рогатого скота посредством молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки сырья с позиции рациональности его дальнейшей переработки.

Объекты и методы исследования. Для генетического анализа образцов сборного сухого цельного и обезжиренного молока, сборного сырого молока применяли разработанный способ, включающий экстракцию ДНК из исследуемых образцов, проведение совмещенной техники ПЦР-ПДРФ, электрофоретическую детекцию результатов и анализ информационных данных с помощью созданных математических алгоритмов (формул) и программного обеспечения.

Результаты и их обсуждение. Определение в сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина с использованием набора праймеров (JK5 и JK3) и эндонуклеазой рестрикции *HinI* для проведения ПЦР-ПДРФ-анализа показало удовлетворительную воспроизводимость и интерпретацию полученных данных. Приведен выданный программой расчет соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина в исследуемых образцах сухого молока, выраженный в процентах доли аллеля *A* с дополнительным указанием абсолютной и относительной погрешностей, а также дополнительным размещением информационного блока сгенерированных числовых показателей для выстроенной процентной шкалы.

Выводы. Созданная специализированная программа «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном», размещенная в открытом сетевом доступе, обеспечивает корректную и оперативную интерпретацию информационных данных, сгенерированных при анализе сухого молочного сырья сборного происхождения.

Ключевые слова. Молочные продукты, казеины, термоустойчивость, сыропригодность, аллель, *CSN3*, ПЦР, ПДРФ, алгоритмы

Для цитирования: Разработка способа определения в сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина / Х. Х. Гильманов, В. К. Семипятный, А. В. Бигаева [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2020. – Т. 50, № 3. – С. 525–535. DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-525-535>.

Original article

Available online at <http://fptt.ru/eng>

New determination method for the ratio of the relative proportions of κ -casein alleles in milk powder

Khamid Kh. Gilmanov*^{ORCID}, Vladislav K. Semipyatnyi^{ORCID}, Alana V. Bigaeva^{ORCID},
Ramil R. Vafin^{ORCID}, Svetlana N. Turovskaya^{ORCID}

All-Russian Dairy Research Institute,
35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia

Received: August 13, 2020
Accepted: September 25, 2020

*e-mail: gilmanov.xx@mail.ru



© Kh.Kh. Gilmanov, V.K. Semipyatnyi, A.V. Bigaeva, R.R. Vafin, S.N. Turovskaya, 2020

Abstract.

Introduction. High-quality dairy products depend on the properties of raw materials. Milk is the basic raw material for all dairy

products. Its quality is subject to requirements of biological safety, and its physicochemical and technological properties comply with strict indicators. κ -casein gene is a basic milk protein. Its allelic variants affect milk productivity, as well as its composition and technological properties, e.g. cheeseability and heat resistance. The research objective was to develop a new method for determining the ratio of the relative proportions of selection-significant kappa-casein gene alleles in bulk cow's milk powder by means of molecular genetics and bioinformatics system. The method can help to test raw materials for further processing rationality.

Study objects and methods. The research included a genetic analysis of samples of bulk whole milk powder, bulk powdered skimmed milk, and bulk raw milk. The developed method involved DNA extraction, combined PCR-RFLP technique, electrophoretic results, and analysis detection of information data using new mathematical algorithms and software.

Results and discussion. The ratio of the relative proportions of the kappa-casein gene alleles in milk powder was determined using primer sets JK5 and JK3, as well as restriction endonuclease *HinfI* for PCR-RFLP analysis. The experiment showed satisfactory reproducibility and interpretation of the obtained data. The program provided a ratio calculation of the kappa-casein gene alleles relative proportions in the studied milk powder samples, expressed as a percentage of the A allele proportion with additional indication of the absolute and relative errors. It also placed the information block of the generated numerical indicators into the percentage scale.

Conclusion. The developed methodology was implemented by a set of laboratory procedures. The new specialized program "Calculation of the relative proportions ratio of κ -casein alleles in bulk milk" is on open access. It provides a correct and prompt data interpretation, generated during the analysis of dry milk raw materials of bulk origin.

Keywords. Milk products, casein, heat resistance, cheese suitability, allele, *CSN3*, PCR, RFLP, algorithms

For citation: Gilmanov KhKh, Semipyatnyi VK, Bigaeva AV, Vafin RR, Turovskaya SN. New determination method for the ratio of the relative proportions of κ -casein alleles in milk powder. Food Processing: Techniques and Technology. 2020;50(3):525–535. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2020-3-525-535>.

Введение

Государственная политика в области пищевой промышленности нацелена на поддержание здоровья граждан путем удовлетворения потребностей населения в сбалансированном питании с учетом привычек и традиций, экономических и физиологических возможностей [1, 2]. Важность молока и молочных продуктов в этом вопросе бесспорна. Совокупность сбалансированности макро- и микрокомпонентов, высокой пищевой ценности и хорошей усвояемости делает молоко незаменимым пищевым продуктом в рационе питания. Высокотехнологичные приемы переработки молока, в том числе производство сухого молока, позволяют снабжать разнообразными молочными продуктами население как труднодоступных регионов, так и городских агломераций, снимая вопрос сезонности молочной отрасли [3]. В основе производства высококачественных пищевых продуктов, в том числе молочных, лежит ценность поступающего на переработку сырья.

К молоку как к сырьевому ингредиенту для выработки большого ассортимента молочных продуктов, таких как сыр, творог, кисломолочные продукты, консервы и др., включая группы функциональных и геродиетических продуктов питания, предъявляются повышенные требования в части биологической безопасности и соответствия его физико-химических и технологических свойств регламентируемым показателям [4–7].

Сухое молоко – универсальный сырьевой компонент. Он позволяет преодолеть проблему сезонности сырого молока с возможностью его доставки в испытывающие дефицит отдаленные районы, обеспечивая стабильность сырьевых ресурсов и качество восстановленных продуктов

переработки молока [3]. Однако выход и качество готовой продукции обусловлены эффективностью переработки поступающего молочного сырья [8]. В связи с этим необходимо акцентировать внимание на таких технологических свойствах молока как термоустойчивость и сыропригодность.

Термоустойчивость молока или способность белковых систем молока выдерживать высокотемпературную обработку без коагуляции предопределяет возможность получения молочных продуктов длительного хранения [9]. Сыропригодность молока или способность его коагулировать под воздействием сычужного фермента с образованием плотного казеинового сгустка – необходимое условие для производства сычужных сыров [10].

Использование генетических маркеров, ассоциированных с качественными признаками молочной продуктивности, оказывающими влияние на состав и технологические свойства молока, находит широкое применение в животноводстве. В качестве одного из таких маркеров рассматривается ген κ -казеина (*CSN3*), локализованный на 6-ой хромосоме генома *Bos taurus* [11, 12]. Из 13 охарактеризованных вариантов гена κ -казеина крупного рогатого скота часто встречаемыми у большинства пород молочного направления являются аллели *A* и *B* *CSN3*, кодирующие соответствующие структурные элементы белков, различающиеся двумя аминокислотными заменами в 136 и 148 положениях полипептидной цепи [13, 14].

В научной литературе аллели *A* и *B* гена *CSN3* признаны взаимосвязанными с молочной продуктивностью, а также составом и технологическими свойствами молока [11, 12, 14–16]. Молоко от коров с генотипами *AB* и *BB* имеет диаметр

мицелл казеина менее 200 нм, тогда как с генотипом *AA* – более 200 нм [13]. Это оказывает определенное влияние на его коагуляционные свойства [17]. При этом не все исследователи трактуют взаимосвязь аллелей *A* и *B* с технологическими свойствами молока однозначно. Это может быть связано с дифференциацией исследуемых выборок животных и объемами технологических выработок в рамках эксперимента [8].

Однако большинство авторов по итогам своих исследований находят, что молоко от коров с превалированием аллеля *B* по гену *CSN3* характеризуется высоким содержанием жира, белка, сухих веществ и лучшей сыропригодностью [12–14, 18]. Следовательно, в рамках рациональной переработки целесообразно использовать молоко для производства сыров и продуктов молочнокислого брожения. В тоже время наиболее термостойким считается молоко от коров с преобладанием аллеля *A* по гену *CSN3* с рекомендацией его применения для выработки питьевого пастеризованного и стерилизованного молока с длительным сроком хранения и молочных консервов [19].

Одним из естественных компонентов молока являются соматические клетки, влияющие не только на продуктивность коров, но и на качество молока. При этом ряд научных работ показал возможность использования этих клеток в качестве ДНК-содержащего материала, который может быть исследован в образцах сырого и сухого молока молекулярно-генетическими методами [20–22]. Разработка и применение новых подходов и решений по оценке качества сборного сухого молока, в том числе на основе ДНК-технологий, является актуальной задачей [7].

Целью настоящей работы являлась разработка способа определения в сухом молоке соотношения относительных долей аллелей селекционно-значимого гена κ -казеина крупного рогатого скота посредством молекулярно-генетической и биоинформационной системы оценки сырья с позиции рациональности его дальнейшей переработки.

Объекты и методы исследования

Объекты экспериментальных исследований: образцы сборного сухого цельного и обезжиренного молока (СЦМ и СОМ), а также сборного сырого молока с известным соотношением относительных долей аллелей гена κ -казеина крупного рогатого скота в качестве эталона.

Разработанный способ определения в сборном сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина крупного рогатого скота включает экстракцию ДНК из исследуемых образцов, проведение совмещенной техники полимеразной цепной реакции и полиморфизма

длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), учет результатов амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот методом электрофореза и анализ информационных данных, в т. ч. интерпретируемых с помощью созданных математических алгоритмов (формул) и программного обеспечения.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-С-М» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Буфер для лизирующего реагента и раствор для отмывки 1 выдерживали при температуре 64 °С («Термит», ДНК-технология, Россия) до полного растворения кристаллов.

В пробирки типа Eppendorf помещали навески исследуемых образцов (для СЦМ и СОМ – масса 50 мг; для сборного сырого молока – объем 1,5 мл) и плотно закрывали крышки. Пробирки с образцами сборного сырого молока 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).

В каждую пробирку с исследуемыми образцами СЦМ, СОМ или сборного сырого молока добавляли буфер для лизирующего реагента и лизирующий реагент в количествах 400 мкл и 17 мкл соответственно.

Содержимое пробирок тщательно перемешивали и при плотно закрытых крышках осаждали капли на вортексе («FV-2400», Biosan, Латвия). Затем пробирки термостатировали при температуре 64 °С в течение 60 мин («Термит», ДНК-технология, Россия), периодически (5 раз через каждые 10–12 мин) встряхивая на вортексе.

Нерастворившиеся частицы образцов седиментировали в процессе центрифугирования («СМ-50», Elmi, Латвия) при 12 000 об/мин в течение 5 мин.

В новые пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками отдельным наконечником добавляли по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального, предварительно подвергнутого интенсивному встряхиванию на вортексе.

Отдельными наконечниками с фильтрами из пробирок с лизированными образцами отбирали надосадочную жидкость объемом 200–350 мкл и переносили в пробирки с сорбентом. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе, затем пробирки помещали в штатив на 10 мин, периодически встряхивая (каждые 2 мин). Далее пробирки центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 60 с. Из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя аспиратор с колбой ловушкой, удаляли надосадочную жидкость.

Таблица 1. ПЦР-ПДРФ-протокол для амплификации и эндонуклеазного расщепления локуса *CSN3*-гена крупного рогатого скота

Table 1. PCR-RFLP protocol for amplification and endonuclease cleavage of the bovine *CSN3* gene locus

ПЦР-протокол

Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			13	130
dNTP	2,5 мМ	0,25 мМ	2	20
SE буфер	10×	1×	2	20
Taq ДНК полимеразы	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	
ВСЕГО			20	

Нуклеотидные последовательности праймеров:

JK5: 5'-ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG-3'. JK3: 5'-GCCCATTTGCGCTTCTCTGTAACAGA-3'.

Режим термоциклирования (амплификатор «Терцик», «ДНК-технология», Россия):

×1:94 °C – 240 с;

×35:94 °C – 10 с, 63 °C – 10 с, 72 °C – 10 с;

×1:72 °C – 420 с.

ПЦР-продукт 350 bp

ПДРФ-протокол

Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			12,25	122,5
SE-буфер O	10×	1×	2,5	25
<i>Hinf</i> I	20 ед	5 ед	0,25	2,5
ПЦР-проба			10	
ИТОГО			25	

Инкубация при 37 °C в течение 12 ± 2 ч

ПЦР-ПЦРФ-фрагменты

Генотип AA = 134/131/85 bp

Генотип BB = 265/85 bp

Генотип AB = 265/134/131/85 bp

В пробирки вносили по 300 мкл раствора для отмывки 1 и, плотно закрыв крышки, встряхивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Затем пробирки центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 60 с. Далее из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя аспиратор с колбой ловушкой, удаляли надосадочную жидкость.

В пробирки добавляли по 500 мкл раствора для отмывки 2. Плотно закрыв крышки, пробирки встряхивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 60 с. Затем из каждой пробирки удаляли надосадочную жидкость отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя аспиратор с колбой ловушкой. Процедуры внесения раствора для отмывки 2, центрифугирования и удаления надосадочной жидкости осуществляли повторно.

Пробирки с открытыми крышками помещали в термостат с температурой 64 °C на 8 ± 2 мин для подсушивания сорбента универсального, добавляли по 50 мкл буфера для элюции B, перемешивали содержимое на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Затем пробирки снова термостатировали 8 ± 2 мин при температуре 64 °C,

периодически (1 раз в минуту) перемешивая на вортексе. Далее пробирки центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 60 с. Надосадочную жидкость использовали в качестве пробы ДНК для постановки ПЦР.

Проведение ПЦР-ПДРФ. Реагенты для проведения ПЦР: деионизированная вода (dH₂O); смесь dNTP (2,5 мМ каждого)¹; Taq ДНК полимеразы (5 ед/мкл)¹; буфер для Taq ДНК полимеразы (10×)¹; праймеры JK5 и JK3 (25 мкМ каждого); проба ДНК.

Реагенты для проведения ПДРФ: деионизированная вода (dH₂O); SE-буфер O для рестриктазы (10×)¹; эндонуклеаза рестрикции *Hinf*I (20 ед/мкл)¹; ПЦР-проба.

Исходные и рабочие концентрации реагентов и поочередно вносимые их объемы для приготовления реакционных смесей представлены в соответствующем ПЦР-ПДРФ-протоколе, изначально используемом для генотипирования крупного рогатого скота по *CSN3*-гену (табл. 1). В протоколе указаны нуклеотидные последовательности праймеров, режим термоциклирования и размер генерируемого ПЦР-продукта в части ПЦР-протокола, а также режим инкубирования и размер

¹ Производство ООО «СибЭнзим», Россия.

генерируемых ПЦР-ПДРФ-фрагментов в части ПДРФ-протокола.

Детекция результатов амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот методом электрофореза и анализ информационных данных.

1. Приготовление рабочего 1× ТАЕ буфера. К 10 мл концентрированного 50× трис-ацетатного электродного буфера (ЗАО «Синтол», Россия) добавляли дистиллированную воду, доводя объем до 500 мл. Хорошо перемешивали. Далее в электродный 1× ТАЕ буфер вносили 15 мкл 1 % раствора этидиума бромида.

2. Приготовление 2 % агарозного геля. Навеску агарозы массой 2 г (Biotechnology Grade, Amresco, США) переносили в стеклянную колбу из термостойкого стекла объемом 250 мл и добавляли 100 мл готового рабочего раствора электрофорезного буфера. Содержимое колбы перемешивали вращательными движениями и помещали в микроволновую печь, выдерживая при мощности 800 Вт в течение 90 с до полного растворения агарозы. Затем колбу с расплавленной агарозой вынимали и аккуратно перемешивали содержимое плавными вращательными движениями. Далее колбу с агарозой вторично помещали в микроволновую печь на 90 с, доводя агарозу до кипения. Колбу вынимали из микроволновой печи и остужали содержимое до температуры 65–70 °С, аккуратно перемешивая содержимое вращением колбы.

3. Расплавленную агарозу заливали в форму камеры. Толщина агарозного геля должна быть около 6 мм.

4. После полного застывания геля аккуратно вынимали из него гребенку. Подложку с готовым гелем помещали в камеру для горизонтального электрофореза («SE-2», Хеликон, Россия), куда затем заливали готовый электродный буфер выше уровня геля на 5 мм.

5. Пробирки с продуктами амплификации помещали в штатив. В чистые пробирки отбирали по 10 мкл ПЦР-пробы. В них добавляли 2 мкл буфера для нанесения (10× SE-буфер для нанесения с красителем, ООО «СибЭнзим», Россия). Затем окрашенные амплификаты вносили в лунки геля, используя новый наконечник для каждой пробы.

6. Камеру подключали к источнику питания и включали его («Эльф-4», ДНК-Технология, Россия). Запрограммированные параметры: выходное напряжение – 150 В, выходной ток – 150 мА, выходная мощность – 50 Вт. Время электрофореза – 30 мин.

7. Камеру отключали от источника питания сразу после окончания электрофореза. Гель переносили на трансиллюминатор системы геле-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.

8. Программно рассчитывали значение абсолютного количества (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта длиной 350 bp (band) каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности. Для этого задавали значение контрольной (эталонной) ПЦР-пробе² первой повторности, равное 100, выбрав единицу измерения – none, выставив линейную регрессию – Linear. Полученные в ходе анализа данные были необходимы для расчета отбираемого объема ПДРФ-пробы для внесения в лунки агарозного геля по формуле:

$$U = 100 \times 20 / Q \quad (1)$$

где U – отбираемый объем ПДРФ-пробы для внесения в лунки агарозного геля за исключением контрольной ПДРФ-пробы первой повторности, мкл; 100 – значение абсолютного количества (Quantity) контрольной ПЦР-пробы первой повторности; 20 – отбираемый объем контрольной ПДРФ-пробы первой повторности для внесения в лунки агарозного геля, мкл; Q – значение абсолютного количества (Quantity) детектируемого ПЦР-продукта анализируемой контрольной ПЦР-пробы второй повторности, а также последующих ПЦР-проб в двойных повторностях, рассчитанных программно.

9. Пробирки с продуктами эндонуклеазного расщепления помещали в штатив, отбирали из них рассчитанный, согласно п. 8, объем ПДРФ-пробы и вносили в чистые пробирки с последующим смешиванием с 2 мкл буфера для нанесения. Затем окрашенные ПДРФ-пробы вносили в лунки геля, используя новый наконечник для каждой пробы.

10. Камеру подключали к источнику питания и включали его. Запрограммированные параметры: выходное напряжение – 150 В, выходной ток – 150 мА, выходная мощность – 50 Вт. Время электрофореза – 40 мин.

11. После завершения времени электрофореза выключали источник питания, переносили гель на трансиллюминатор системы геле-документирования «Gel Doc XR+» с поддержкой программного обеспечения («Image Lab», Bio-Rad, США). Получали изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы с последующим его анализом и документированием.

12. Программно рассчитывали для каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности значение абсолютного количества (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 этого задавали значение Quantity, равное 100 для band 1 (265 bp) каждой пробы, выбрав единицу измерения – none, выставив линейную регрессию

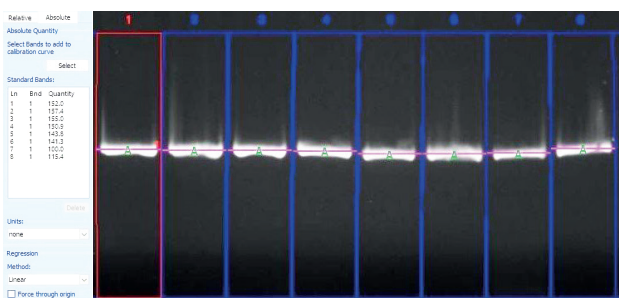


Рисунок 1. Электрофореграмма результата ПЦР-анализа исследуемых образцов с праймерами JK5+JK3 и программный расчет значения абсолютного количества (Q) детектируемого ПЦР-продукта длиной 350 bp каждой анализируемой ПЦР-пробы в двойной повторности (скриншот обработанных данных в «Image Lab»).

1 – ПЦР-проба образца COM1 первой повторности (152,0);
 2 – ПЦР-проба образца COM1 второй повторности (157,4);
 3 – ПЦР-проба образца COM2 первой повторности (155,0);
 4 – ПЦР-проба образца COM2 второй повторности (150,9);
 5 – ПЦР-проба образца СЦМ первой повторности (143,8);
 6 – ПЦР-проба образца СЦМ второй повторности (141,3);
 7 – ПЦР-проба контрольного образца (генотип $CSN3^{AB}$) первой повторности (100,0); 8 – ПЦР-проба контрольного образца (генотип $CSN3^{AB}$) второй повторности (115,4)

Figure 1. Electropherogram of the result of PCR analysis of test samples with primers JK5 + JK3 and software calculation of the absolute amount (Q) of the detected PCR product of 350 bp in length for each analyzed PCR sample in duplicate (a screenshot of the processed data in the Image Lab). 1 – PCR test of the COM1 sample of the first replication (152.0); 2 – PCR sample of the COM1 sample of the second replication (157.4); 3 – PCR sample of the COM2 sample of the first replication (155.0); 4 – PCR sample of the COM2 sample of the second replication (150.9); 5 – PCR sample of the SCM sample of the first replicate (143.8); 6 – PCR sample of the SCM sample of the second replicate (141.3); 7 – PCR test of the control sample (genotype $CSN3^{AB}$) of the first replication (100.0); 8 – PCR sample of the control sample (genotype $CSN3^{AB}$) of the second replication (115.4)

– Linear. Полученные в ходе анализа данные были необходимы для определения в сборном сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена $CSN3$.

13. На следующем этапе последовательно рассчитывали числовой показатель контрольной

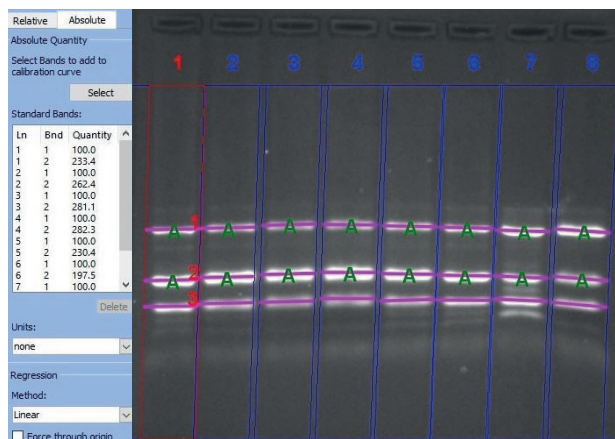


Рисунок 2. Электрофореграмма результата ПЦР-ПДРФ-анализа по аллельным вариантам A и B гена $CSN3$ с праймерами JK5+JK3 и эндонуклеазным расщеплением рестриктазой $HinfI$, включая программный расчет значений абсолютного количества (Q1/Q2) детектируемых ПЦР-ПДРФ-фрагментов (скриншот обработанных данных в «Image Lab»).

1 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца COM1 первой повторности (100/233,4); 2 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца COM1 второй повторности (100/262,4); 3 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца COM2 первой повторности (100/281,1); 4 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца COM2 второй повторности (100/282,3); 5 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца СЦМ первой повторности (100/230,4); 6 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль образца СЦМ второй повторности (100/197,5); 7 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль контрольного образца (генотип $CSN3^{AB}$) первой повторности (100/54,4); 8 – $HinfI$ -ПДРФ-профиль контрольного образца (генотип $CSN3^{AB}$) второй повторности (100/49,5)

Figure 2. Electropherogram of the result of PCR-RFLP analysis for allelic variants A and B of the $CSN3$ gene with primers JK5 + JK3 and endonuclease digestion with the restriction enzyme $HinfI$, including the software calculation of the absolute amount (Q1 / Q2) of the detected PCR-RFLP-processed fragments (a screenshot in Image Lab). 1 – $HinfI$ -RFLP-profile of the COM1 sample of the first replication (100/233.4); 2 – $HinfI$ -RFLP profile of the COM1 sample of the second replication (100/262.4); 3 – $HinfI$ -RFLP-profile of the sample COM2 of the first replication (100/281.1); 4 – $HinfI$ -RFLP-profile of the COM2 sample of the second replication (100/282.3); 5 – $HinfI$ -RFLP-profile of the SCM sample of the first replicate (100/230.4); 6 – $HinfI$ -RFLP profile of the CMM sample of the second replication (100/197.5); 7 – $HinfI$ -RFLP-profile of the control sample (genotype $CSN3^{AB}$) of the first replication (100/54.4); 8 – $HinfI$ -RFLP-profile of the control sample (genotype $CSN3^{AB}$) of the second replication (100/49.5)

Таблица 2. Отбираемые объемы ПДРФ-проб для внесения в лунки агарозного геля

Table 2. Selected volumes of RFLP samples to be put into agarose gel wells

№	ПЦР-проба образца сборного сухого молока	Quantity	Отбираемый объем ПДРФ-пробы, мкл
1	ПЦР-проба образца COM1 первой повторности	152,0	13,1
2	ПЦР-проба образца COM1 второй повторности	157,4	12,7
3	ПЦР-проба образца COM2 первой повторности	155,0	12,9
4	ПЦР-проба образца COM2 второй повторности	150,9	13,2
5	ПЦР-проба образца СЦМ первой повторности	143,8	13,9
6	ПЦР-проба образца СЦМ второй повторности	141,3	14,1
7	Контрольная ПЦР-проба первой повторности (генотип $CSN3^{AB}$)	100,0	20,0
8	Контрольная ПЦР-проба второй повторности (генотип $CSN3^{AB}$)	115,4	17,3

Таблица 3. Установленные значения абсолютных количеств Quantity (Q1 и Q2) детектируемых ПДРФ-фрагментов с длинами 265 bp (band 1) и 134/131 bp (band 2) проанализированных ПДРФ-проб с выведенным среднеарифметическим ЧП

Table 3. Established values of the absolute amounts of Quantity (Q1 and Q2) of the detected RFLP fragments with lengths of 265 bp (band 1) and 134/131 bp (band 2) of the analyzed RFLP samples with the derived arithmetic mean index

№ п.п	ПДРФ-проба образца сборного сухого молока	Quantity band 1 (Q1)	Quantity band 2 (Q2)	ЧП
1	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СОМ1 первой повторности	100	233,4	0,403
2	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СОМ1 второй повторности	100	262,4	
3	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СОМ2 первой повторности	100	281,1	0,355
4	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СОМ2 второй повторности	100	282,3	
5	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СЦМ первой повторности	100	230,4	0,467
6	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль образца СЦМ второй повторности	100	197,5	
7	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль контрольного образца (генотип <i>CSN3^{AB}</i>) первой повторности	100	54,4	1,925
8	<i>HinfI</i> -ПДРФ-профиль контрольного образца (генотип <i>CSN3^{AB}</i>) второй повторности	100	49,5	

ПДРФ-пробы² первой и второй повторности (с последующим выведением среднеарифметического значения) по формуле:

$$\text{ЧП} = Q1 / Q2 \quad (2)$$

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

14. Выстраивали процентную шкалу соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* (прописывая долю аллеля *A CSN3* в процентном выражении, оставшаяся часть которого приходилась на долю аллеля *B CSN3*) с расчетом соответствующего числового показателя, предварительно рассчитав ожидаемое значение Quantity для band 1 ($oQ1$) и band 2 ($oQ2$) по формулам:

$$oQ1 = B\% \times nQ1 / kB\% \quad (3)$$

где $oQ1$ – ожидаемое значение Quantity для band 1; $B\%$ – доля аллеля *B* в процентном выражении выстраиваемой шкалы; $nQ1$ – наблюдаемое значение Quantity для band 1 контрольной ПДРФ-пробы, равное 100; $kB\%$ – доля аллеля *B* контрольной ПДРФ-пробы, %.

$$oQ2 = A\% \times nQ2 / kA\% \quad (4)$$

где $oQ2$ – ожидаемое значение Quantity для band 2; $A\%$ – доля аллеля *A* в процентном выражении

выстраиваемой шкалы; $nQ2$ – наблюдаемое среднеарифметическое значение Quantity для band 2 контрольной ПДРФ-пробы; $kA\%$ – доля аллеля *A* контрольной ПДРФ-пробы, %.

15. Оперирова получеными значениями, рассчитывали числовой показатель для выстроенной процентной шкалы соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3* по формуле:

$$\text{шЧП} = oQ1 / oQ2 \quad (5)$$

где шЧП – числовой показатель для выстроенной процентной шкалы соотношения относительных долей аллелей гена *CSN3*; $oQ1$ – ожидаемое значение Quantity для band 1; $oQ2$ – ожидаемое значение Quantity для band 2.

16. Рассчитывали для каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности ЧП согласно формуле, отраженной в п. 13 с последующим выведением среднеарифметического значения.

17. 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 и относительной погрешности (\pm %).

Разработанная программа «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном» размещена в открытом доступе по адресу <https://www.wolframcloud.com/obj/e90009f8-53de-4c24-8980-837061c0ee22>.

Результаты и их обсуждение

Результаты генетического тестирования образцов СОМ и СЦМ на предмет определения в сборном сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина с использованным набором праймеров (JK5 и JK3) эндонуклеазы рестрикции *HinfI* для проведения ПЦР-ПДРФ-анализа показали удовлетворительную воспроизводимость и интерпретацию полученных данных.

² Контрольные (эталонные) ПЦР- и ПДРФ-пробы формировались из числа образцов сборного сухого молока, сборного сырого молока с известным соотношением относительных долей аллелей гена κ -казеина крупного рогатого скота, прошедших этапы пробоподготовки, экстракции, амплификации и эндонуклеазного расщепления нуклеиновых кислот. В качестве контрольного (эталонного) образца также использовали препарат ДНК, выделенный из коровьего молока с генотипом *AB* гена *CSN3* с относительной долей аллеля *A*, равной 50 %.



Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном

при учете теоретической процентной шкалы контроля

50
 54.4; 49.5
 Введите последовательность чисел, десятичный разделитель - точка
 Образцы:

Наименование образца	nQ2 образца	
<input type="text" value="СОМ1"/>	<input type="text" value="233.4; 262.4"/>	-
<input type="text" value="СОМ2"/>	<input type="text" value="281.1; 282.3"/>	-
<input type="text" value="СЦМ"/>	<input type="text" value="230.4; 197.5"/>	-

Рисунок 3. Интерфейс разработанной программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном» на начальном этапе внесения соответствующих данных

Figure 3. Interface of the developed program “Calculation of the ratio of the relative proportions of alleles of κ -casein in bulk milk” at the input stage

Праймеры JK5 и JK3 инициировали амплификацию локуса гена *CSN3* крупного рогатого скота длиной 350 bp (рис. 1).

В таблице 2 представлены рассчитанные по формуле (1) отбираемые объемы ПДРФ-проб исследуемых образцов для внесения в лунки агарозного геля.

*Hinf*I-ПДРФ-анализ генерируемых генотип-специфичных фрагментов ($AA = 134/131/85$ bp, $BB = 265/85$ bp и $AB = 265/134/131/85$) обеспечивал корректную процедуру генетического тестирования исследуемых образцов (рис. 2).

В таблице 3 представлены программно сгенерированные для каждой анализируемой ПДРФ-пробы в двойной повторности значения абсолютного количества Q2 детектируемых ПДРФ-фрагментов с длинами 134/131 bp (band 2) при установленном значении Q1 для band 1 (265 bp), равном 100, с последующим расчетом среднеарифметического числового показателя (ЧП) согласно формуле (2).

На рисунке 3 показан принцип работы программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном» с внесением соответствующих данных: доля аллеля *A* контрольной ПДРФ-пробы, выраженная в процентах (кА, %); наблюдаемое (среднеарифметическое) значение Quantity для band 2 контрольной ПДРФ-пробы (nQ контроля); информация об исследуемом

Образец	Доля аллеля A	Абсолютная погрешность	Относительная погрешность
СОМ1	82.67%	±0.8398%	±1.016%
СОМ2	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 4. Интерфейс разработанной программы «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном» на заключительном этапе выдачи результата расчета

Figure 4. Interface of the developed program “Calculation of the ratio of the relative proportions of alleles of κ -casein in bulk milk” at the final stage

образце (наименование образца); наблюдаемое (среднеарифметическое) значение Quantity для band 2 анализируемой ПДРФ-пробы (nQ образца).

На рисунке 4 показан выданный программой результат расчета соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина в исследуемых образцах сборного сухого молока, выраженный в процентах доли аллеля *A* с дополнительным указанием абсолютной и относительной погрешностей. Также ниже приведен информационный блок сгенерированных числовых показателей для выстроенной процентной шкалы.

Выводы

Производство молока, полученного от коров желаемого генотипа по гену *CSN3*, – многоступенчатый процесс. Он связан с решением ряда задач, включающих в себя комплекс зоотехнических, ветеринарных, технологических и экономических аспектов работы. Элементы ДНК-технологии прижизненного формирования молочной продуктивности животных, состава и технологических свойств молока, успешно внедренные в селекционно-племенную деятельность, также могут быть интегрированы в молекулярно-генетическую и биоинформационную систему оценки сырья и продуктов его переработки.

Представленная в настоящей работе методология разработанного способа определения в сборном сухом молоке соотношения относительных долей аллелей гена κ -казеина крупного рогатого скота реализована комплексом лабораторных процедур, включающих выделение нуклеиновых кислот,

проведение ПЦР-ПДРФ, электрофорезную детекцию и анализ полученных результатов математическими алгоритмами и программным обеспечением. При этом созданная специализированная программа «Расчет соотношения относительных долей аллелей κ -казеина в молоке сборном», размещенная в открытом сетевом доступе, обеспечивает корректную и оперативную интерпретацию информационных данных.

Дальнейшее развитие данного направления позволит усовершенствовать алгоритмы математического моделирования оценочных критериев уровня соответствия технологических свойств сборного коровьего молока рекомендуемым показателям по свертываемости и термоустойчивости, а также оптимизировать технологии производства молочных продуктов в контексте предварительной молекулярно-генетической и биоинформационной

системы оценки сырья с позиции рациональности его дальнейшей переработки.

Критерии авторства

Авторы в равной степени участвовали в подготовке и написании статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

All the authors bear equal responsibility for the content of the article.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы

1. Role of organic products in the implementation of the state policy of healthy nutrition in the Russian Federation / Z. Yu. Belyakova, I. A. Makeeva, N. V. Stratonova [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 4–13. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-4-13>.
2. Genes and eating preferences, their roles in personalized nutrition / A. Vesnina, A. Prosekov, O. Kozlova [et al.] // *Genes*. – 2020. – Vol. 11, № 4. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11040357>.
3. 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, № 12. – P. 10779–10789. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17229>.
4. Юрова, Е. А. Критерии оценки молока-сырья для получения продукта гарантированного качества / Е. А. Юрова, Д. Н. Мельденберг, Е. Ю. Парфенова // *Молочная промышленность*. – 2019. – № 4. – С. 26–29. DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2019-4-26-28>.
5. Changes in physico-chemical properties of milk under ultraviolet radiation / V. D. Kharitonov, N. E. Sherstneva, D. V. Kharitonov [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 161–167. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-161-167>.
6. Genetic identification of bovine leukaemia virus / I. M. Donnik, R. R. Vafin, A. G. Galstyan [et al.] // *Food and Raw Materials*. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 314–324. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-2-314-324>.
7. Современные подходы к хранению и эффективной переработке сельскохозяйственной продукции для получения высококачественных пищевых продуктов / А. Г. Галстян, Л. М. Аксёнова, А. Б. Лисицын [и др.] // *Вестник Российской академии наук*. – 2019. – Т. 89, № 5. – С. 211–213. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-5873895539-542>.
8. Effects of the detailed protein composition of milk on curd yield and composition measured by model micro-cheese curd making of individual milk samples / V. Bonfatti, D. R. de Freitas, A. Lugo [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2019. – Vol. 102, № 9. – P. 7863–7873. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15743>.
9. Huppertz, T. Heat stability of milk / T. Huppertz // *Advanced dairy chemistry. Volume 1B: Proteins: applied aspects* / P. L. H. McSweeney, J. A. O'Mahony. – New York : Springer, 2016. – P. 179–196. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_7.
10. Study of fatty acid composition of milk for cheese production / E. V. Topnikova, V. A. Mordvinova, G. M. Sviridenko [et al.] // *Food systems*. – 2019. – Vol. 2, № 4. – P. 34–37. DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-4-34-37>.
11. 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, № 3. – P. 493–497. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2016_1454.
12. Candidate gene of milk protein for genetic improvement of dairy cattle / S. A. Asmarasari, C. Sumantri, A. Gunawan [et al.] // *Wartazoa: Buletin Ilmu Peternakan Dan Kesehatan Hewan Indonesia*. – 2019. – Vol. 29, № 2. – P. 97–107. DOI: <https://doi.org/10.14334/wartazoa.v29i2.1890>.
13. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants and glycosylation of κ -casein / E. Bijl, R. de Vries, H. van Valenberg [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2014. – Vol. 34, № 1. – P. 135–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.001>.

14. Association of *HindIII*-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in Holstein cattle / M. Miluchová, M. Gábor, J. Candrák [et al.] // *Acta Biochimica Polonica*. – 2018. – Vol. 65, № 3. – P. 403–407. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2017_2313.
15. 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, № 12. – P. 9–13.
16. Technological properties of milk of cows with different genotypes of kappa-casein and beta-lactoglobulin / S. V. Tyulkin, R. R. Vafin, L. R. Zagidulin [et al.] // *Foods and Raw Materials*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 154–162. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-154-162>.
17. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows / A. Wedholm, L. B. Larsen, H. Lindmark-Mansson [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2006. – Vol. 89, № 9. – P. 3296–3305. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72366-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72366-9).
18. Genetic formation factors of dairy efficiency and quality of cattle milk / I. M. Donnik, O. G. Loretts, O. A. Bykova [et al.] // *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 4, № 11. – P. 4163–4169. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1048989>.
19. Ефремов, А. А. Технологические свойства молока коров разных генотипов по каппа-казеину / А. А. Ефремов, С. В. Карамаев, Н. В. Соболева // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2011. – Т. 32, № 1. – С. 157–160.
20. New rapid method of DNA isolation from milk somatic cells / J. Pokorska, D. Kułaj, M. Dusza [et al.] // *Animal Biotechnology*. – 2016. – Vol. 27, № 2. – P. 113–117. DOI: <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1116446>.
21. Liao, J. Purification procedures meaningfully influence DNA quantification in milk / J. Liao, Y. Liu // *LWT – Food Science and Technology*. – 2018. – Vol. 94. – P. 8–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.031>.

References

1. Belyakova ZYu, Makeeva IA, Stratonova NV, Pryanichnikova NS, Bogatyrev AN, Diel F, et al. Role of organic products in the implementation of the state policy of healthy nutrition in the Russian Federation. *Foods and Raw Materials*. 2018;6(1):4–13. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-4-13>.
2. Vesnina A, Prosekov A, Kozlova O, Atuchin V. Genes and eating preferences, their roles in personalized nutrition. *Genes*. 2020;11(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11040357>.
3. Galstyan AG, Petrov AN, Illarionova EE, Semipyatnyy VK, Turovskaya SN, Ryabova AE, et al. Effects of critical fluctuations of storage temperature on the quality of dry dairy product. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(12):10779–10789. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17229>.
4. Yurova EA, Meldenberg DN, Parfenova EYu. Criteria of the raw milk assessment used to obtain products with guaranteed quality. *Dairy industry*. 2019;(4):26–29. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31515/1019-8946-2019-4-26-28>.
5. Kharitonov VD, Sherstneva NE, Kharitonov DV, Yurova EA, Kurchenko VP. Changes in physico-chemical properties of milk under ultraviolet radiation. *Foods and Raw Materials*. 2019;7(1):161–167. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-161-167>.
6. Donnik IM, Vafin RR, Galstyan AG, Krivonogova AS, Shaeva AY, Gilmanov KhKh, et al. Genetic identification of bovine leukaemia virus. *Food and Raw Materials*. 2018;6(2):314–324. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-2-314-324>.
7. Galstyan AG, Aksenova LM, Lisitsyn AB, Oganesyants LA, Petrov AN. Modern approaches to storage and effective processing of agricultural products for obtaining high quality food products. *Herald of the Russian Academy of Sciences*. 2019;89(2):211–213. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-5873895539-542>.
8. Bonfatti V, de Freitas DR, Lugo A, Vicario D, Carnier P. Effects of the detailed protein composition of milk on curd yield and composition measured by model micro-cheese curd making of individual milk samples. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(9):7863–7873. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15743>.
9. Huppertz T. Heat stability of milk. In: McSweeney PLH, O'Mahony JA, editors. *Advanced dairy chemistry. Volume 1B: Proteins: applied aspects*. New York: Springer; 2016. pp. 179–196. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_7.
10. Topnikova EV, Mordvinova VA, Sviridenko GM, Danilova ES. Study of fatty acid composition of milk for cheese production. *Food systems*. 2019;2(4):34–37. DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2019-2-4-34-37>.
11. Neamț RI, Saplacan G, Acatincai S, Csiszter LT, Gavojdian D, Ilie DE. The influence of *CSN3* and *LGB* polymorphisms on milk production and chemical composition in Romanian Simmental cattle. *Acta Biochimica Polonica*. 2017;64(3):493–497. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2016_1454.
12. Asmarasari SA, Sumantri C, Gunawan A, Taufik E, Anggraeni A. Candidate gene of milk protein for genetic improvement of dairy cattle. *Wartazoa: Buletin Ilmu Peternakan Dan Kesehatan Hewan Indonesia*. 2019;29(2):97–107. DOI: <https://doi.org/10.14334/wartazoa.v29i2.1890>.
13. Bijl E, de Vries R, van Valenberg H, Huppertz T, van Hooijdonk T. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants and glycosylation of k-casein. *International Dairy Journal*. 2014;34(1):135–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.001>.

14. Miluchová M, Gábor M, Candrák J, Trakovická A, Candráková K. Association of *HindIII*-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in Holstein cattle. *Acta Biochimica Polonica*. 2018;65(3):403–407. DOI: https://doi.org/10.18388/abp.2017_2313.
15. Ionel NR, Ilie D, Toma CL. Effects of sires genotyping for k-Casein on *B* allele frequency in Romanian Brown Cattle. *Research Journal of Biotechnology*. 2017;12(12):9–13.
16. Tyulkin SV, Vafin RR, Zagidulin LR, Akhmetov TM, Petrov AN, Diel F. Technological properties of milk of cows with different genotypes of kappa-casein and beta-lactoglobulin. *Foods and Raw Materials*. 2018;6(1):154–162. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2018-1-154-162>.
17. Wedholm A, Larsen LB, Lindmark-Månsson H, Karlsson AH, Andrén A. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2006;89(9):3296–3305. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72366-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72366-9).
18. Donnik IM, Loretts OG, Bykova OA, Shkuratova IA, Isaeva AG, Krivonogova AS. Genetic formation factors of dairy efficiency and quality of cattle milk. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;4(11):4163–4169. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.1048989>.
19. Yefremov AA, Karamaev SV, Soboleva NV. Technological properties of milk produced by cows of different genotypes as to kappa-casein. *Izvestia Orenburg State Agrarian University*. 2011;32(1):157–160. (In Russ.).
20. Pokorska J, Kułaj D, Dusza M, Żychlińska-buczek J, Makulska J. New rapid method of DNA isolation from milk somatic cells. *Animal Biotechnology*. 2016;27(2):113–117. DOI: <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1116446>.
21. Liao J, Liu Y. Purification procedures meaningfully influence DNA quantification in milk. *LWT – Food Science and Technology*. 2018;94:8–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.031>.

Сведения об авторах

Гильманов Хамид Халимович

канд. био. наук, научный сотрудник, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 236-02-36, e-mail: kh_gilmanov@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0001-7053-6925>

Семипятный Владислав Константинович

канд. техн. наук, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, e-mail: semipyatniy@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-1241-0026>

Бигаева Алана Владиславовна

младший научный сотрудник, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 236-02-36, e-mail: a_bigaeva@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0001-8400-2465>

Вафин Рамиль Ришадович

д-р био. наук, профессор РАН, старший научный сотрудник, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 236-02-36, e-mail: r_vafin@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0003-0914-0053>

Туровская Светлана Николаевна

старший научный сотрудник, ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», 115093, Россия, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, тел.: +7 (499) 236-02-36, e-mail: s_turovskaya@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0002-5875-9875>

Information about the authors

Khamid Kh. Gilmanov

Cand.Sci.(Bio.), Researcher, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-02-36, e-mail: kh_gilmanov@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0001-7053-6925>

Vladislav K. Semipyatniy

Cand.Sci.(Eng.), All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, e-mail: semipyatniy@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-1241-0026>

Alana V. Bigaeva

Junior Researcher, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-02-36, e-mail: a_bigaeva@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0001-8400-2465>

Ramil R. Vafin

Dr.Sci.(Bio.), Professor of the RAS, Senior Researcher, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-02-36, e-mail: r_vafin@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0003-0914-0053>

Svetlana N. Turovskaya

Senior Researcher, All-Russian Dairy Research Institute, 35, Lyusinovskaya Str., Moscow, 115093, Russia, phone: +7 (499) 236-02-36, e-mail: s_turovskaya@vnimi.org
<https://orcid.org/0000-0002-5875-9875>