

Ассоциация полиморфизмов в биокластере генов казеина и сывороточных белков с технологическими свойствами молочного сырья

Елена Евгеньевна Илларионова, научный сотрудник
Александр Геннадьевич Кручинин, канд. техн. наук, заведующий лабораторией
Светлана Николаевна Туровская, старший научный сотрудник
Алана Владиславовна Бигаева, младший научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности
E-mail: a_kruchinin@vniimi.org

Мировые тенденции в области пищевых технологий направлены на более эффективную и глубокую переработку белковых компонентов молочного сырья с целью повышения вариативности и создания разнонаправленной специализации продуктового ассортимента. Методы биомолекулярной аналитики позволяют исследовать полиморфизмы таких наиболее значимых генетических локусов у крупного рогатого скота, как α 1-казеин (CSN1S1), α 2-казеин (CSN1S2), β -казеин (CSN2), κ -казеин (CSN3), β -лактоглобулин (BLG) и α -лактальбумин (LALBA), отвечающих за экспрессию молочных белков и ассоциированных с аллельными и генотипическими эффектами на удой, состав и технологические качества молока-сырья. В статье отражены результаты наиболее значимых научных изысканий с целью идентификации комбинаций аллелей и комплексных генотипов фракций молочных протеинов у отдельных пород КРС с выявлением ассоциаций молекулярной вариативности и признаков количественной и качественной продуктивности, влияющих на технологические свойства молока.

Ключевые слова: молоко, технологические свойства, генотип, аллель, полиморфизм, казеин.

Illarionova E.E., Kruchinin A.G., Turovskaya S.N., Bigaeva A.V.
Association of polymorphisms in the biocluster of casein and whey protein genes with technological properties of dairy raw materials
All-Russian Dairy Research Institute (VNIIMI)

Global trends in the field of food technologies are aimed at more efficient and deep processing of protein components of dairy raw materials in order to increase the variability and create a multidirectional specialization of the product range. Biomolecular analysis methods allow us to study the polymorphisms of the most significant genetic loci in cattle, such as α 1-casein (CSN1S1), α 2-casein (CSN1S2), β -casein (CSN2), κ -casein (CSN3), β -lactoglobulin (BLG) and α -lactalbumin (LALBA), which are responsible for the expression of milk proteins and are associated with allelic and genotypic effects on milk yield, composition and technological qualities of raw milk. The article reflects the results of the most significant scientific research aimed at identifying combinations of alleles and complex genotypes of milk protein fractions in individual breeds of cattle, identifying associations of molecular variability and signs of quantitative and qualitative productivity that affect the technological properties of milk.
Key words: milk, technological traits, genotype, genetic factors, allele, polymorphism, casein.

Повсеместное внедрение молекулярных методов исследований на основе ПЦР-диагностики и секвенирования открыло новые возможности для молочного животноводства и производителей молочной продукции в области идентификации, подробной характеристики протеинового профиля молока, интактных белков и последовательностей пептидов, формируя научную базу по обеспечению пищевых отраслей биологически ценным сырьем с прогнозируемыми технологическими параметрами [1].

Результаты исследований в разных странах выявляют генетическую изменчивость в локусах основных генов молочных белков и, как следствие, не только широкую межвидовую вариативность, но также внутривидовую и внутривидовую аллельную изменчивость. Это обуславливает различия в физико-химическом составе молока, особенно фракционном составе белков, а также оказывает существенное влияние на его технологические свойства [2–5].

Казеиновый кластер молока представлен генами κ -казеина (CSN3),

α 1-казеина (CSN1S1), α 2-казеина (CSN1S2) и β -казеина (CSN2), картированными на хромосоме 6. Два наиболее изучаемых сывороточных белка — α -лактальбумин (LALBA) и β -лактоглобулин (LGB) кодируются генами, картированными соответственно на хромосомах 5 и 11 [6].

Согласно обзору номенклатуры молочного белка у различных пород крупного рогатого скота выявлено 8 аллельных вариантов для гена CSN1S1 (A, B, C, D, E, F, G, H), 4 — для CSN1S2 (A, B, C, D), 12 — для CSN2 (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H 1, H 2, I), 11 — для CSN3 (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J), 11 — для LGB (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W) и 3 варианта — для LALBA (A, B, C), а научные изыскания последних лет открывают все большее аллельное разнообразие [6, 7].

Многочисленные исследования молекулярной вариативности представленных локусов у КРС идентифицируют полиморфизмы, ассоциированные с аллельными и генотипическими эффектами на надой, состав, термостойкость и сыропригодность молока. Большинство авторов отмечают

их воздействие как на абсолютные, так и относительные концентрации отдельных белковых фракций. Наиболее выраженный эффект обнаружен для гена CSN3, где аллельный вариант B оказывает положительное влияние на концентрацию κ -казеина в молоке и ассоциирован с меньшим средним размером казеиновых мицелл, а A-аллель обуславливает его термоустойчивость. Молоко от животных, несущих B-аллель в генотипе, демонстрирует лучшую способность к сычужной коагуляции и более высокие показатели выхода сыра [2–4].

Полиморфизм гена CSN2, как правило, детерминирует количество жира и белка, а аллельная изменчивость гена LGB значительно влияет на содержание β -лактоглобулина. Некоторыми исследователями отмечено благоприятное совокупное воздействие B-аллельных вариантов по генам CSN2 и LGB на коагуляцию сычужного фермента и сыропригодность молока [6]. Кроме того, в молоке от животных, несущих генотип BB по гену LGB, содержится больше общего казеина и несколько меньше

сывороточных белков. Такие различия обуславливают заметное положительное влияние аллеля *B* гена *LGB* на пригодность молока в сыроделии.

Аллельные полиморфизмы генов *CSN1S1* и *CSN1S2* не являются столь значимыми по влиянию на признаки молока. Однако некоторые исследователи отмечают их воздействие в составе комплексных генотипов. Например, в блоке генотипов *CSN1S1-CSN2-CSN1S2* обнаружены существенные ассоциации как с молочной продуктивностью, так и содержанием белка. Для гена *CSN1S2* выявлены три отрицательных и два положительных составных генотипа, влияющих на удои и выход белка [8]. Полиморфизм гена сывороточного белка α -лактальбумина также обнаруживает взаимосвязь с технологическими свойствами молока. *A*-аллель гена *LALBA* ассоциирован с более высокими удоями, а *B*-аллель — с более высоким процентным содержанием белка и жира. Животные с генотипом *BB* имеют преимущество по содержанию казеина и жира в молоке в сравнении с животными с генотипом *AA*, а гетерозиготный вариант по этому локусу — *AB* показывает средний уровень значений по всем признакам [6].

Учеными факультета химии, биотехнологии и пищевых наук Норвежского университета естественных наук (NMBU) отмечены такие улучшенные коагуляционные свойства, как менее продолжительное время свертывания сычужного фермента и более высокая плотность творога через 30 мин после добавления сычужного фермента, для варианта *C* гена *CSN1S1* и вариантов *B* генов *CSN3*, *CSN2* и *LGB*. В образцах кисломолочного продукта генотипы *LGB* оказывали заметное влияние на степень синерезиса и предел текучести. Повышение предела текучести и уменьшение степени синерезиса наблюдали в генотипах *AB* по гену *LGB* по сравнению с генотипом *BB*, более подверженным синерезису. Изображения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (CSLM) показали менее пористую структуру продукта, меньшую степень синерезиса и несколько более высокое содержание белка в образцах из молока от животных с генотипом *AB* гена *LGB* по сравнению с генотипом *BB*. Также отмечено значительное влияние генотипа *BC* гена *CSN1S1* на уменьшение степени синерезиса по сравнению с генотипом *BB*. Поскольку аллели *B* как

для гена *CSN3*, так и *LGB* связаны с более высокой концентрацией общего белка и в совокупности с меньшим размером казеиновых мицелл, указанные факторы также могут влиять на коагуляционные качества молока. Кроме того, генотип *BC* гена *CSN1S1* ассоциирован с более высоким процентом молочного белка в сравнении с генотипом *BB*, обуславливающим положительное влияние на удои [2].

Учеными Университета Базиликата и Университета Палермо (Италия) проанализированы 326 коров породы *Cinisara* защищенного региона происхождения для производства сыра *Caciocavallo Palermitano* (Сицилия). Выявлено, что генотип *BB* по гену *CSN3* связан с увеличением надоев и наилучшими сыропригодными свойствами молока, а генотип *AA* по гену *LGB* ассоциирован с высокой молочной продуктивностью. Помимо этого генотип *BB* по гену *CSN3* связан с большей общей мицеллярной поверхностью, что облегчает действие сычужного фермента [3].

Исследователями Университета Чапинго (Мексика) проведен метаанализ по установлению влияния генов *CSN3* и *LGB* на показатели надоев коров пород гольштейн, джерси, коричневой швейцарской и симментальской. Исследование молока коров гольштейн и джерси выявило значительное воздействие генотипа *AA* гена *CSN3* на надои. Аналогичное влияние оказывал генотип *AA* гена *LGB* для этих пород. В оценке коричневой швейцарской и симментальской пород генотип *BB* гена *CSN3* был наиболее тесно связан с молочной продуктивностью. По гену *LGB* также генотипы *BB* и *AB* коррелировали с высокой молочной продуктивностью и общим содержанием сухих веществ по сравнению с другими генотипами [4].

Определенный интерес представляет изучение ассоциации генетических полиморфизмов отдельных белковых фракций с проведением сычужной и кислотной коагуляции молока при унифицированных концентрациях белка. Ученые NMBU провели ряд работ в этом направлении. Общее содержание белка в отдельных пробах молока было стандартизировано посредством лабораторного процесса ультрафильтрации с целью определить сохранится ли воздействие генетических полиморфизмов белковых фракций на коагуляционные свойства молока. Пробы молока 18 норвежских

красных коров имели генотип *A2A2* по гену *CSN2* и различные генотипы по генам *CSN1S1* (*BB* или *BC*), *CSN3* (*AA* или *BB*) и *LGB* (*AB* или *BB*). Содержание белка в исходном молоке составляло от 2,82 до 3,58 %, в ретентате — от 5,95 до 6,06 %.

Генотипы гена *CSN1S1* не оказали влияния на способность к сычужной коагуляции ни молока, ни ретентата, в то время как генотипы по гену *CSN3* значительно коррелировали только с показателями сыропригодности ретентата. Генотип *AA* по гену *CSN3* показывал меньшую продолжительность сычужного свертывания и высокую плотность сгустка через 30 мин в сравнении с генотипом *BB*. Результаты кислотной коагуляции выявили корреляцию генотипа *AA* гена *CSN3* с показателями сыропригодности в исходном молоке и ретентате, выраженную меньшим временем гелеобразования, более высокими скоростью гелеобразования и стойкостью геля через 60 мин по сравнению с генотипом *BB*. Генотипы *LGB* влияли как на исходное молоко, так и ретентат, при этом лучшие показатели отмечены у молока коров с генотипом *AB*.

Полученные результаты не вполне согласуются с выводами, сделанными большей частью исследователей в отношении молока коров других пород при различных концентрациях общего белка, о благоприятном влиянии аллельных вариантов *B* по генам *CSN3* и *LGB* на сычужную свертываемость [5].

В последнее время значимым направлением исследований является изучение влияния не только отдельных генетических вариантов, но и комплексных (составных) генотипов молочных белков на качественные показатели молока и его способность к коагуляции [6, 8–10].

Специалистами NMBU секвенированы биоматериалы 31 животного норвежской красной породы по генам *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB*. Наиболее распространенными аллелями для каждого из четырех локусов явились: *B* по гену *CSN1S1*, *A2* по *CSN2*, *A* по *CSN3* и аллель *B* по гену *LGB*. Выявленные частоты встречаемости генотипов составляли: по гену *CSN1S1* — *BB* (83 %), *BC* (16 %) и *CC* (1 %); по гену *CSN2* — *A2A2* (64 %), *A1A2* (30 %) и ниже 3 % по генотипам *A1A1*, *A1B* и *A2B*; по гену *CSN3* — *AA* (43 %), *BB* (36 %) и менее чем у 10 % присутствовали генотипы *BE*, *AB* и *AE*; по гену *LGB* — *BB* (45 %), *AB* (41 %) и *AA* (14 %).

Составные генотипы (*CSN1S1-CSN2-CSN3*) *BB-A2A2-BB* и *BB-A2A2-AA* обнаружены у 23 % коров по сравнению с *BB-A1A1-AA*, *BC-A2A2-BB* и *BB-A1A2-BE* (около 10 %). Остальные составные генотипы представлены единичными случаями. Результаты исследований показали выраженное положительное влияние генотипа *BB* по гену *CSN3* на содержание жира и показатели сычужной свертываемости, а генотипа *AA* — на кислотную коагуляцию. Генотипы *BC* по гену *CSN1S1*, *A1A2* по гену *CSN2* и *AB* по гену *LGB* также имели лучшие результаты в пробах на сыропригодность по сравнению с другими вариантами. Однако генетические полиморфизмы в этих локусах не оказывали влияния на показатели кислотной коагуляции в исследуемой выборке. Составной генотип (*CSN1S1-CSN2-CSN3*) *BB-A2A2-AA* был ассоциирован с лучшими показателями кислотной коагуляции и неудовлетворительными результатами сычужного свертывания.

По оценке воздействия генетических полиморфизмов молочных белков на содержание белковых фракций отмечено влияние: генотипа *BC* по гену *CSN1S1* на увеличение общего количества белка и снижение β -казеина; генотипа *A1A2* по гену *CSN2* на увеличение количества β - и κ -казеина; генотипов *BB* и *AB* гена *CSN3* на повышение концентрации κ -казеина; генотипов *AA* и *AB* по гену *LGB* на более высокую относительную концентрацию β -лактоглобулина. Более высокую концентрацию общего белка и более низкую β -казеина наблюдали в комплексном генотипе *BC-A2A2-BB* по сравнению с остальными составными генотипами. Лучшие свойства сычужной коагуляции отмечены в образцах *BC-A2A2-BB* и *BB-A1A2-AA*, в то время как составной генотип *BB-A2A2-AA* ассоциирован с наиболее высокими показателями по кислотному свертыванию. В целом отмечено, что генотипы и их комплексы, способствующие сычужному свертыванию, показывали неудовлетворительные результаты в отношении кислотной коагуляции и наоборот. При этом два составных генотипа *BB-A2A2-BB* и *BB-A1A2-BE* были связаны с плохими как сычужными, так и кислотными коагуляционными свойствами [2, 5].

В Университете Базиликата также выполнена работа по изучению влияния комплексных генотипов казеина (*CSN1S1-CSN2-CSN3*) на качество, коагуляцию и характеристики молока

у итальянских коров голштинской породы. Статистический анализ выявил в молоке с генотипом *BB-A1A1-AA* наибольшее содержание жира, в то время как для составного генотипа *BB-A2A2-BB* отмечены значительная белково-молочность, лучшие параметры коагуляции и высокий выход сыра [9].

Группа ученых из Дании и Швеции провела анализ способности к сычужной коагуляции и относительных белковых профилей в молоке коренных шведских коров Swedish Mountain и Swedish Red Polled, сравнивая их с массивом термоустойчивых и сыропригодных образцов молока современных шведских красных коров. Местные породы показали очень низкую распространенность термоустойчивого молока и превосходные свойства сычужной коагуляции по сравнению со шведскими красными коровами. Преобладающими аллельными вариантами у обеих аборигенных пород были *B* по гену *CSN1S1*, *A2* по гену *CSN2* и *B* по гену *LGB*. Для гена *CSN3* вариант *B* был преобладающим у Swedish Mountain, тогда как вариант *A* наиболее часто встречался у Swedish Red Polled [10].

Представленные работы свидетельствуют о том, что на сегодняшний день не существует четкой тенденции, определяющей влияние конкретных генотипов и их комплексов на признаки молочной продуктивности и качество получаемого молока. Результаты по разным породам и ареалам имеют отличия возможно ввиду неодинакового белкового состава и разнонаправленного влияния исследуемых локусов.

Научный опыт, накопленный исследователями разных стран, представляет несомненный интерес для российских ученых в аспекте отслеживания генетической вариативности, оказывающей значительное воздействие на состав получаемого молочного сырья и его восприимчивость к определенным режимам в процессе технологической обработки. Классификационный подход к определению полиморфизмов молочных белков в перспективе не только обеспечит получение сырья с определенными качественными и количественными характеристиками, но также может быть использован для генетической маркировки пород при определении молока, пригодного в конкретном технологическом цикле.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Рябова, А.Е.** Апробация способов проведения PCR-RFLP и AS-PCR для генотипирования крупного рогатого скота по гену DGAT1/ А.Е. Рябова [и др.]// *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия геологии и технических наук*. 2019. Т. 3. № 435. С. 60–66. DOI: <https://doi.org/10.32014/2019.2518-170X.68>.
2. **Ketto, I.A.** The influence of milk protein genetic polymorphism on the physical properties of cultured milk/ I.A. Ketto [et al.]// *International Dairy Journal*. 2018. V. 78. P. 130–137. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.009>.
3. **Gregorio, P.** Effects of different genotypes at the CSN3 and LGB loci on milk and cheese-making characteristics of the bovine Cinisara breed/ P.Gregorio [et al.]// *International Dairy Journal*. 2017. V. 71. P. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.001>.
4. **Zepeda-Batista, J.L.** Potential influence of κ -casein and β -lactoglobulin genes in genetic association studies of milk quality traits/ J.L.Zepeda-Batista [et al.]// *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 2017. № 30 (12). P. 1684–1688. DOI: 10.5713/ajas.16.0481.
5. **Ketto, I.A.** Effect of milk protein genetic polymorphisms on rennet and acid coagulation properties after standardisation of protein content/ I.A. Ketto [et al.]// *International Dairy Journal*. 2019. V. 88. P. 18–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.008>.
6. **Caroli, A.M.** Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition/ A.M.Caroli, S.Chessa, G.J.Erhardt// *Journal of Dairy Science*. 2009. V. 92, Issue 11. P. 5335–5352. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>.
7. **Гильманов, Х.Х.** Элементы ДНК-технологии формирования качественного и безопасного сырья/ Х.Х.Гильманов [и др.]// *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия геологии и технических наук*. 2020. Т. 5. № 443. С. 54–62. DOI: 10.32014/2020.2518-170X.104.
8. **Nilsen, H.** Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle/ H.Nilsen [et al.]// *Genetics Selection Evolution*. V. 41. Article number: 24 (2009). DOI: 10.1186/1297-9686-41-24.
9. **Perna, A.** The influence of casein haplotype on quality, coagulation, and yield traits of milk from Italian Holstein cows/ A.Perna [et al.]// *Journal of Dairy Science*. 2016. V. 99. Issue 5. P. 3288–3294. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10463>.
10. **Poulsen, N.A.** Comparison of milk protein composition and rennet coagulation properties in native Swedish dairy cow breeds and high-yielding Swedish Red cows/ N.A.Poulsen [et al.]// *Journal of Dairy Science*. 2017. V. 100. Issue 11. P. 8722–8734. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12920>.