

Инфракрасная спектроскопия молока

Новые возможности в селекции и менеджменте стада

Александр СЕРМЯГИН, кандидат сельскохозяйственных наук
Наталья ЗИНОВЬЕВА, доктор биологических наук
ВИЖ им. Л. К. Эрнста
Александр ЕРМИЛОВ
Иван ЯНЧУКОВ, доктора сельскохозяйственных наук
ОАО «Московское» по племенной работе»

Развитие новых направлений селекции и использование инновационных инструментов отбора животных не может быть обеспечено только за счет стандартного подхода к учету количественных признаков. Точность показателей и эффективность методов по их фенотипированию — это ключевые составляющие селекции в животноводстве, в особенности геномной селекции, которая, благодаря применению десятков тысяч полиморфных маркеров, позволяет ожидать повышения генетического роста в краткосрочной и среднесрочной перспективе.

В последние годы производители молочной продукции изменили концепцию подхода к ее качеству с учетом требований рынка. Так, например, сегодня рассматривают показатели свертываемости молока (для повышения выхода сыра) и его жирнокислотный состав (основной критерий оценки питательной и биологической ценности молока). Именно поэтому более детальный анализ молока может помочь в поиске селекционных путей улучшения его качественных и количественных параметров.

Необходимость в быстром, недорогом и высокопроизводительном методе химического анализа молока стимулировала использование такой технологии, как инфракрасная спектроскопия. Она основывается на принципах взаимодействия между веществом и волнами электромагнитного излучения. Их длина варьирует в разных диапазонах: видимого светового спектра — в пределах 350–800 нм, ближнего инфракрасного — 800–2500 нм, среднего инфракрасного — 2500–25 000 нм, микровол-

нового — 100 мкм — 1 см и т. д. Проходя через вещество, излучение вызывает колебание молекул, которое выражается в большем или меньшем поглощении полученной энергии импульса.

Используя регрессионную модель, по разнице между заданным и поглощенным объемом излучения определяют расчетный химический состав вещества и входящих в него соединений. Таким образом, применение инфракрасной спектроскопии среднего диапазона излучения для массового скрининга количественных и качественных параметров молока коров представляется актуальным.

Введение дополнительных параметров оценки количественного и качественного состава молока (следы ацетона, бета-гидроксимасляной кислоты, а также содержание мочевины) должно положительно сказаться на реализации генетического потенциала животного за счет контроля и возможности коррекции паратипических факторов (для нормализации белково-углеводного обмена веществ в организме коров, повышения

фертильности, увеличения сроков хозяйственного использования и улучшения качества получаемой продукции).

Изучение жирнокислотного состава молока поможет проводить отбор в популяциях по совокупности необходимых параметров, в числе которых — мононенасыщенные и полиненасыщенные жирные кислоты, и элиминировать менее желательные — насыщенные жирные кислоты и трансизомеры жирных кислот (они могут вызывать хронические заболевания — атеросклероз сосудов, сердечную недостаточность и ожирение). Сегодня выделено около 400–500 вариантов жирных кислот молока.

Генетическая изменчивость большинства компонентов молока варьирует в пределах 7–30%. Некоторые параметры — концентрация мочевины, ацетона, бета-гидроксимасляной кислоты и точка замерзания — на первый взгляд могут показаться неперспективными для учета в селекции, так как отражают реакцию животного на изменение рациона, технологии производства молока и др. Тем не менее популяционный мониторинг может помочь в отборе наиболее устойчивых и адаптированных животных в системе взаимодействия «генотип — среда». Контроль состава молока по большому числу показателей даст возможность изучить процесс обмена веществ в организме коровы для поиска генетических механизмов регуляции метаболизма.

Перед нами стояла задача проанализировать состав молока голштинизированной популяции коров черно-пестрой и голштинской пород с применением полногеномных данных для определения направления селекции и оценки эффективности использования спектра жирных кислот молока и основных метаболитов обмена веществ организма в менеджменте стада.

В эксперименте задействовали 11 529 коров голштинизированной черно-пестрой и голштинской пород из 14 племенных хозяйств Московской области. Число быков-отцов составляло 778 голов. Исследование проб молока проводили на базе Регионального информационно-селекционного центра (РИСЦ) (г. Ногинск) на инфракрасном спектрометрическом анализаторе. Компания-производитель предоставила дополнительные калибровки для расширенного анализа молока по таким показателям, как объем казеинового кластера белков, жирнокислотный состав и модуль выгрузки спектральных данных для каждой анализируемой пробы.

Созданная с декабря 2017-го по май 2018 г. база данных компонентного состава молока включала 37 002 результата по таким параметрам, как массовая доля жира (МДЖ), массовая доля белка (МДБ), массовая доля лактозы (МДЛ), сухое вещество (СВ), сухой обезжиренный молочный остаток (СОМО), точка замерзания (ТЗ), мочевины (U), следы ацетона (АС) и бета-гидроксипутирата (ВНВ), логарифмические значения для параметров АС и ВНВ, число соматических клеток (SCC) и их нормированная оценка (SCS), процент казеиновой фракции белка молока, концентрация жирных кислот — миристиновой (C14 : 0, то есть 14 атомов углерода без двойных связей), пальмитиновой (C16 : 0), стеариновой (C18 : 0), олеиновой (C18 : 1), содержание насыщенных жирных кислот (SFA), мононенасыщенных жирных кислот (MUFA), полиненасыщенных жирных кислот (PUFA), короткоцепочечных жирных кислот (SCFA, C4...C10), среднецепочечных жирных кислот (MCFA, C12...C16), длинноцепочечных жирных кислот (LCFA, C17...C22) и трансизомеров жирных кислот (TIFA).

Используя спектр из 20 показателей, вполне реально провести скрининг животных и стада по продуктив-

ным качествам (энергетическая и питательная ценность молока, его пригодность для производства масла и сыра), фертильности и состоянию здоровья (табл. 1).

Расчет показателей наследуемости состава молока коров осуществляли с помощью программы REMLF90 с учетом фиксированных данных — «стадо», «год, месяц и контрольный день доения» и «номер лактации». Учитывали показатели коров в возрасте 1–13 лактаций. Состав молока этих животных анализировали по большому количеству параметров (расширенный анализ компонентов).

С точки зрения селекционной значимости наследуемость состава молока, или генетическая обусловленность по ряду признаков, оказалась перспективной для таких параметров, как МДБ (22,4%), казеиновая фракция (20,1%), МДЛ (30,0%), SCS (21,1%) и СОМО (15,2%). Спектр жирных кислот характеризовался умеренными коэффициентами наследуемости (6,6–13,5%), C14 : 0 ($h^2 = 13,5\%$), MUFA ($h^2 = 10,2\%$), MCFA ($h^2 = 10,9\%$), SCFA ($h^2 = 10,6\%$) — максимальными. Коэффициент наследуемости SFA составил 8,4%, а наиболее желательной — PUFA — лишь 1%.

В структуре жировой фракции молока большая доля приходилась на C16 : 0 (44,9%), C18 : 1 (21,3%) и на MCFA (53,7%). Общее количество желательных ненасыщенных жирных кислот достигло 24,5%.

На рисунке 1 представлена цветочная матрица, отражающая взаимосвязь между жирными кислотами, входящими в состав молока коров.

Отметим, что насыщенные жирные кислоты (C14 : 0 — C18 : 0) положительно коррелировали друг с другом и с SFA. Ненасыщенные жирные кислоты (на примере полиненасыщенных соединений и трансизомеров PUFA, TIFA) отрицательно коррелировали с насыщенными жирными кислотами, что подтверждает возможность снижения в них доли менее желательных липидных соединений за счет селекции.

Распределение взаимосвязей кислот по длине углеродной цепи также отражало известные закономерности: длинноцепочечные жирные кислоты имели слабую или отрицательную корреляцию с изомерами средней и короткой длины, при этом их содержание в молоке не зависело от числа молекулярных

связей собственно в структуре жирных кислот.

Показатели наследственного влияния на изменчивость жирных кислот, полученные в процессе наших исследований, соответствовали данным, опубликованным в научной литературе. По всей видимости, есть предпосылки отбора животных с желательным составом молока (оно должно быть пригодным для производства питьевого молока, сливочного масла с высокой долей ненасыщенных жирных кислот, а также продукции, основу которой составляют твердые жиры или насыщенные жирные кислоты, — мягких и твердых сыров, творожных изделий).

Полногеномный анализ показал, что существует высокозначимый уровень ассоциации между удоем за 305 дней лактации, нуклеотидной заменой в гене DGAT1 ($p < 4,2 \times 10^{-4}$), кодирующем синтез липидов и жирных кислот молока, а также близлежащей мутацией в гене ABCG2 ($p < 7,5 \times 10^{-8}$), отвечающем за контроль метаболических путей протеиновой фракции. Это свидетельствует о наличии желательных генов, находящихся под давлением отбора (рис. 2).

Полученные нами геномные значения полностью совпадают с данными исследований зарубежных коллег в части поиска ДНК-маркеров, сопряженных с насыщенными жирными кислотами (C14 : 0, C16 : 0), некоторыми ненасыщенными жирными кислотами и жирными кислотами со средней длиной углеродной цепи.

Дополнительными инструментами анализа эффективности использования энергии рациона и питательных веществ корма служат такие показатели, как остаточные метаболиты ацетона и путирата в молоке. Так, их избыток может свидетельствовать о нарушении обмена веществ в организме коров, например о развитии кетоза (патология, при которой из-за дефицита углеводов животное активно расходует собственный жир, чтобы восполнить потребность в энергии).

Скармливание кормосмесей, содержащих много концентрированных кормов и мало легкоусвояемых углеводов, приводит к угнетению микрофлоры рубца и, соответственно, к ухудшению переваривания клетчатки (целлюлозы). В этом случае увеличивается образование масляной кислоты и кетонных тел, что ведет к неполному их распаду

Таблица 1

| Биомаркеры расширенного анализа молока | |
|--|---|
| Показатель | Вариант возможного использования в селекции и менеджменте стада |
| МДЛ | Энергетическая ценность молока, оценка вкусовых качеств |
| SCC, SCS | Оценка риска возникновения субклинической формы мастита |
| ТЗ | Технологический репламент доения, оценка фальсификации молока |
| U | Оценка баланса между содержанием энергии в рационе и потреблением протеина корма |
| АС, ВНВ | Мониторинг риска возникновения субклинической формы кетоза |
| Казеиновая фракция | Белкомолочность, выход сыра |
| C14 : 0, C16 : 0, C18 : 0, SFA | Жирномолочность, обмен веществ, потенциальная продукция метана |
| MUFA, PUFA, C18 : 1 | Фертильность, выход масла, технологические свойства, органолептические качества молока |
| SCFA, MCFA, LCFA | Энергетический статус животного, питательная ценность продукции, здоровье |
| TIFA | Качественные показатели продукции для использования в питании человека, оценка фальсификации молока |

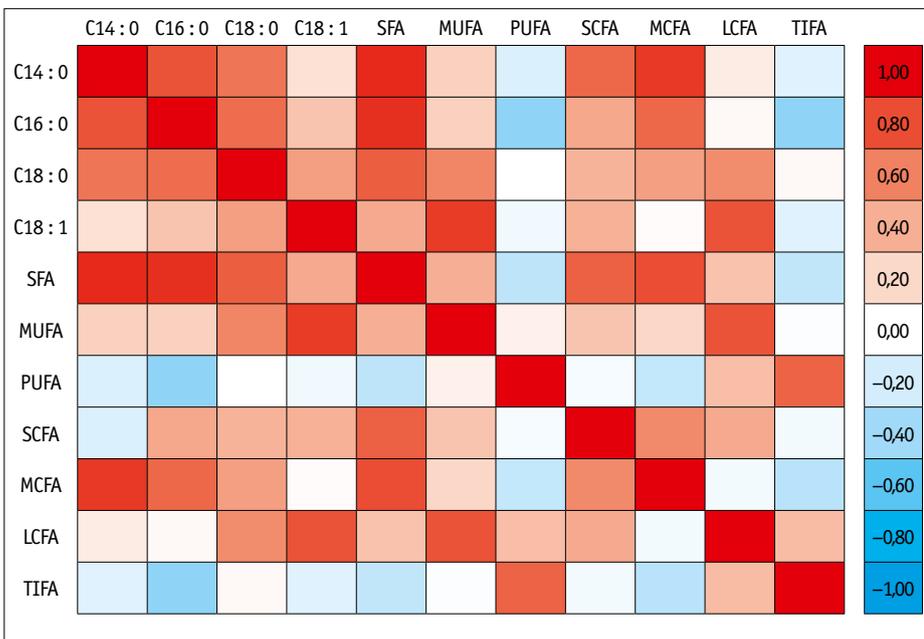


Рис. 1. Корреляционная матрица взаимосвязи между жирными кислотами молока на основе цветовой шкалы (n = 37 014)

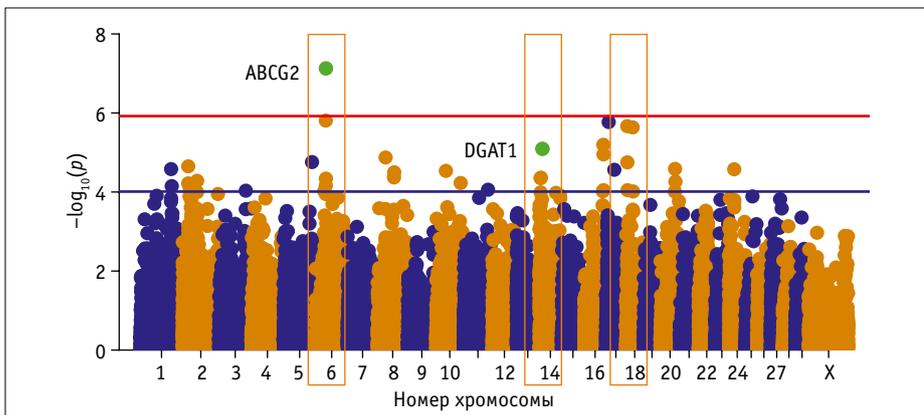


Рис. 2. Распределение однонуклеотидных мутаций в хромосомах молочного скота в связи с уровнем достоверности по Бенджамини — Хохберга (нижняя синяя линия) и по методу Бонферрони (верхняя красная линия) для оценки племенной ценности коров по продуктивности за 305 дней первой лактации

в организме жвачных, снижению удоев и репродуктивных качеств.

Полученные нами результаты, включая логарифмическое выравнивание $h^2 = 0,006-0,018$, показали невысокую генетическую изменчивость параметров АС и ВНВ, что в значительной степени было обусловлено варьированием средовых факторов в широком диапазоне (тип и баланс рациона, организация раздоя и др.). Стоит отметить, что наследуемость такого показателя, как содержание мочевины в молоке коров, составила 8,7%. Это говорит о возможности умеренной нормализации метаболизма в организме животных.

Метод инфракрасной спектроскопии, то есть мониторинг компонентного состава молока (содержание метаболитов, белковой и жировой фракций и т. д.), необходимо использовать не только с целью генетического совершенствования популяции, но и для улучшения менеджмента стада.

В таблице 2 отражена динамика изменения суточного состава молока коров в зависимости от содержания в нем соматических клеток.

Рост числа соматических клеток в молоке на 100 тыс. в 1 мл приводит к снижению суточных удоев в среднем на 0,4 кг. Если количество соматических клеток в 1 мл достигнет 1 млн, удой значительно уменьшится: за сутки — на 4 кг, за лактацию — на 111–802 кг.

Существенным изменениям подвержен такой параметр, как доля молочного белка. При увеличении числа соматических клеток со 100 тыс. до 1 млн в 1 мл этот показатель составит +0,24%, изменение доли основного белка — казеина — только +0,05%. Это свидетельствует о том, что часть детектируемой инфракрасным спектром микрофлоры молока (протеиновая структура бактерий) и воспалительный процесс в тканях вымени «маскировали» истинное содержание МДБ. На это же косвенно указывают повышение точки замерзания молока (с $-0,635$ до $-0,618$ °С), снижение в нем концентрации мочевины и СОМО и наличие следов ацетона и кетоновых тел.

Установлена тесная взаимосвязь между содержанием лактозы в молоке и числом соматических клеток ($r_p = -0,328$), что может быть обусловлено использованием бактериальной микрофлоры молока легкодоступных углеводов. Изменения жирнокислотного состава молока в значительной

степени коснулись тех соединений, которые составляли большую долю от общей жировой фракции, — пальмитиновой и олеиновой жирных кислот, насыщенных жирных кислот, мононенасыщенных жирных кислот и среднецепочечных жирных кислот.

Изменение состава молока под влиянием соматических клеточек (при заболеваниях вымени) негативно сказывается на здоровье и продуктивности коров, на энергетической и питательной ценности сырья и на качестве продукции переработки. Таким образом, содержание в молоке соматических клеточек может служить своеобразным биомаркером, позволяющим выявить животных с субклинической формой мастита, а также диагностировать различные метаболические нарушения.

Постоянный мониторинг — залог экономического успеха предприятия. Компоненты молока коров можно рассматривать и как новые селекционные показатели, и как биомаркеры для оценки качества менеджмента стада.

Экспресс-метод инфракрасной спектроскопии позволяет вести учет изменяющихся параметров (содержание в молоке ацетона, кетоновых тел и мочевины) путем создания базы данных функционального состояния коров на примере группы хозяйств или целого региона и более точно проводить оценку генотипа животных, нивелируя при этом весомое влияние средовых факторов.

Жирнокислотный состав молока — важный инструмент контроля качественных параметров молока, полученного как от одной коровы, так и в популяции, для определения питательной ценности продукции, управления обменом веществ в организме животных и оптимизации рационов.

Таблица 2

Изменение суточного состава молока коров (средние значения)

| Показатель | Градации числа соматических клеточек в молоке, тыс. ед. в 1 мл | | | | | | | |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|---------|----------|--------|
| | < 100 | 101–200 | 201–300 | 301–400 | 401–500 | 501–750 | 751–1000 | > 1001 |
| Количество коров, гол. | 11927 | 2741 | 1240 | 728 | 437 | 710 | 429 | 1574 |
| Надой, кг в сутки | 28,7 | 25,8 | 25,1 | 25,5 | 25,0 | 25,2 | 26,3 | 24,7 |
| МДЖ, % | 4,36 | 4,58 | 4,59 | 4,59 | 4,61 | 4,6 | 4,59 | 4,6 |
| МДБ, % | 3,31 | 3,42 | 3,44 | 3,44 | 3,47 | 3,41 | 3,41 | 3,46 |
| МДЛ, % | 4,93 | 4,84 | 4,81 | 4,82 | 4,78 | 4,81 | 4,77 | 4,69 |
| СВ, % | 13,77 | 13,97 | 13,96 | 13,97 | 14,01 | 13,94 | 13,92 | 13,91 |
| СОМО, % | 10,23 | 10,25 | 10,24 | 10,24 | 10,25 | 10,19 | 10,17 | 10,15 |
| ТЗ, °С | -0,635 | -0,624 | -0,619 | -0,62 | -0,621 | -0,619 | -0,622 | -0,618 |
| U, мг × 100 мл ⁻¹ | 28,4 | 28,1 | 27,2 | 27,1 | 27,3 | 27,1 | 26,2 | 25,2 |
| АС, ммоль/л | 0,078 | 0,071 | 0,072 | 0,074 | 0,084 | 0,076 | 0,084 | 0,082 |
| АС, log ₁₀ | -1,35 | -1,4 | -1,39 | -1,39 | -1,34 | -1,36 | -1,32 | -1,33 |
| ВНВ, ммоль/л | 0,316 | 0,382 | 0,426 | 0,389 | 0,388 | 0,393 | 0,369 | 0,389 |
| ВНВ, log ₁₀ | -0,94 | -0,79 | -0,73 | -0,77 | -0,75 | -0,75 | -0,77 | -0,73 |
| SCS, тыс. ед. в 1 мл | 39,1 | 142,9 | 245 | 345 | 449,1 | 610,9 | 862,6 | 2684,1 |
| SCS, балл | 1,33 | 3,49 | 4,28 | 4,78 | 5,16 | 5,6 | 6,1 | 7,47 |
| Казеин, % | 2,79 | 2,84 | 2,84 | 2,85 | 2,88 | 2,81 | 2,82 | 2,84 |
| C14 : 0, г в 100 г | 0,685 | 0,712 | 0,711 | 0,71 | 0,717 | 0,702 | 0,705 | 0,702 |
| C16 : 0, г в 100 г | 1,746 | 1,896 | 1,923 | 1,915 | 1,907 | 1,922 | 1,898 | 1,929 |
| C18 : 0, г в 100 г | 0,578 | 0,598 | 0,604 | 0,59 | 0,592 | 0,6 | 0,596 | 0,6 |
| C18 : 1, г в 100 г | 0,795 | 0,856 | 0,872 | 0,852 | 0,843 | 0,866 | 0,86 | 0,873 |
| SFA, г в 100 г | 3,547 | 3,744 | 3,75 | 3,749 | 3,748 | 3,74 | 3,734 | 3,732 |
| MUFA, г в 100 г | 0,943 | 1,002 | 1,021 | 1,003 | 1,005 | 1,017 | 1,01 | 1,028 |
| PUFA, г в 100 г | 0,007 | 0,004 | 0,005 | 0,004 | 0,005 | 0,004 | 0,005 | 0,004 |
| SCFA, г в 100 г | 0,552 | 0,564 | 0,558 | 0,561 | 0,56 | 0,554 | 0,556 | 0,543 |
| MCFA, г в 100 г | 2,222 | 2,371 | 2,375 | 2,394 | 2,426 | 2,389 | 2,379 | 2,401 |
| LCFA, г в 100 г | 1,471 | 1,487 | 1,484 | 1,454 | 1,451 | 1,469 | 1,479 | 1,465 |
| TIFA, г в 100 г | 0,045 | 0,027 | 0,025 | 0,026 | 0,02 | 0,023 | 0,028 | 0,022 |

Применение комплекса биомаркеров в конечном итоге позволит улучшить здоровье и функциональное состояние коров, продлить срок их хозяйственного использования и увеличить производство продукции с высокой экономической составляющей.

Выражаем благодарность за помощь в проведении исследований начальнику лаборатории иммуногенетической экспертизы ОАО «Московское» по племен-

ной работе» доктору биологических наук Нурмагомеду Букарову, начальнику отдела лаборатории селекционного контроля качества молока РИСЦ ОАО «Московское» по племенной работе» Елене Кисель и специалисту компании FOSS Russia Ирине Елизаровой.

Исследование №17-44-500324 выполнено при поддержке РФФИ и правительства Московской области.

ЖР
Московская область

