

**МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

07.01 – КМР. 1822 “С” 2022.07.12. 087 ПЗ

**КУБРЯК МАКСИМ СЕРГІЙОВИЧ**

**2024 р**

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

**Факультет:** Тваринництва та водних біоресурсів

УДК 636.2.082.35:637.12.05

**ПОГОДЖЕНО**

Декан факультету

тваринництва та водних біоресурсів

\_\_\_\_\_ Кононенко Р.В.

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

**ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ**

Завідувач кафедри

біології тварин

\_\_\_\_\_ Сахацький М.І.

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

## МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему:** «Характеристика стада ВРХ за поліморфізмом гену капа-казеїну»

Спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(код і назва)

Освітня програма Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва

Орієнтація освітньої програми \_\_\_\_\_ освітньо-наукова

(освітньо-професійна або освітньо-науков)

### Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

доктор с.-г н., с. н. с., професор  
(науковий ступінь та вчене звання)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Кулібаба Р. О.  
(ПІБ)

**Виконав** \_\_\_\_\_  
(підпис)

Кубряк Максим Сергійович  
(ПІБ студента)

**КИЇВ – 2024**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**Факультет тваринництва та водних біоресурсів**

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Завідувач кафедри біології тварин  
Д. б. н., професор Сахацький М.І.  
(науковий ступінь, вчене звання) (підпис) (ПІБ)  
“ ” 2023 року

**З А В Д А Н Н Я**  
ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКО КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ  
Кубряку Максиму Сергійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

Спеціальність 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва»

(код і назва)

Освітня програма Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва

Орієнтація освітньої програми освітньо-наукова (освітньо-  
професійна або освітньо-наукова)

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Характеристика стада ВРХ за поліморфізмом гену капа-казеїну»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “ ” 20 р.

№ \_\_\_\_\_

Термін подання завершеної роботи на кафедру \_\_\_\_\_  
(рік, місяць, число)

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи Охарактеризувати стадо ВРХ за поліморфізмом гену капа-казеїну.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

1. Визначити генотип тварин за геном капа-казеїну;
2. Вивчити протокол проведення ПЛР-ПДРФ;
3. Визначити кореляцію між алелями капа-казеїну та якостями молока;
4. Дослідити як алелі капа-казеїну впливають на молочну продуктивність корів.

Перелік графічного матеріалу (за потреби): таблиці, рисунки.

Дата видачі завдання “ ” 2024 р.

**Керівник магістерської  
кваліфікаційної роботи**

Кулібаба Р. О.

(підпис)

(ПІБ)

**Завдання прийняв до виконання**

Кубряк М. С.

## РЕФЕРАТ

Вміст білка в молоці та його структура, крім усього іншого, беззаперечно мають й провідне економічне і технологічне значення. Вони позначаються на витратах сировини, часі, енергії за виробництва молочних продуктів і сирів. Із підвищенням вмісту білка в молоці збільшується вміст Кальцію і Фосфору, зростає титрована кислотність, посилюється сичужне зсідання, покращується щільність і здатність згустку до синерезису, зменшуються кількість сирного пилу, втрати білка і жиру, тобто майже всі фізико-хімічні показники. Однак щодо породних особливостей формування цих компонентів молока літературні дані досить суперечливі. Наразі не випадково увага дослідників багатьох країн із розвиненим молочним скотарством прикута до пошуку методів підвищення вмісту білка в молоці. Для цього проводиться ефективна і тривала селекційно-племінна робота, кінцева мета якої полягає в розведенні тварин, здатних у конкретних виробничих умовах оплачувати спожиті корми найбільшим виходом високоякісної продукції.

Огляд сучасних джерел свідчить про те, що вивченню поліморфізму гена капа-казеїну у молочних порід ВРХ приділяється велика увага . У той самий час роботи з вивчення поліморфізму гена капа-казеїну у м'ясних порід нечисленні . У зв'язку з тим, що різні алелі даного гена по-різному впливають на показники надою та білка в молоці, цікаво було б виявити, чи існує вплив різних алелей гена капа-казеїну батьків на показники приросту потомства м'ясних порід. Однак такі роботи раніше не проводилися, що і послужило метою нашого дослідження. Іншим цікавим питанням було вивчення зміни частоти алелей гену капаказеїну у популяції породи шароле ВРХ за певний період часу, тому що такі дослідження не відомі, хоча молекулярні маркери (в тому числі структурних генів) набувають велику роль при вивченні динаміки популяцій сільськогосподарських тварин, що може мати не лише теоретичне, але і практичне значення в зв'язку з моніторингом

зберігання рідких алелей в генофонді ВРХ. Казеїни є основним джерелом амінокислот для молодого організму та задіяні в транспортуванні відповідної кількості фосфору і кальцію в молоці, необхідних для формування кісткової тканини. На відміну від інших трьох казеїнових білків, капа-казеїн за своїм амінокислотним складом подібний до фібрину та має властивість за результатами протеолізу формувати згустки. Ця властивість досить давно використовується при виробництві сиру. На основі ДНК-аналізу екзонних ділянок гену CSN3 виявлено декілька нуклеотидних замін та поліморфні сайти рестрикції, описано 9 алельних варіантів (А, В, С, Е, F, G, Н, I і A1), серед яких найбільш часто зустрічаються варіанти А та В. Відмінності між алелями А і В гену CSN3 обумовлені двома точковими мутаціями: амінокислотної заміни треоніну на ізолейцин у положенні 136 поліпептидного ланцюга та аспарагінової кислоти на аланін у положенні 148. Вважається, що молоко яке містить варіант CSN3 В має кращі технологічні характеристики переробки, більший вміст жиру в сирі та його вихід. Генотип CSN3 ВВ є бажаним для формування поголів'я корів, молоко яких використовується при виробництві твердих сирів.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	Ошибка! Закладка не определена.
ВСТУП.....	Ошибка! Закладка не определена.
РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ	Ошибка! Закладка не определена.
1.1 Характеристика гену капа-казеїну.....	Ошибка! Закладка не определена.
1.2. Характеристика молока за різними алелями капа-казеїну	Ошибка! Закладка не определена.
1.3 Амінокислотний склад білків молока .....	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	Ошибка! Закладка не определена.
2.1 .Виділення ДНК.....	Ошибка! Закладка не определена.
2.2 ПЛР-ПДРФ.....	40
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	43
3.1. Аналіз проведених досліджень.....	43
3.2. Детальна характеристика ПЛРПДРФ.....	50
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	46
ВИСНОВКИ.....	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	52

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

MAS - маркер-асоційована селекція;

QTL – локуси кількісних ознак;

RFLP – поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів;

CSN3 – ген капа-казеїну;

ВРХ – велика рогата худоба;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

п.н – пар нуклеотидів.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Сьогодні розвиток тваринництва України потребує впровадження нових методів та підходів, які базуються на безпосередньому аналізі спадкової інформації на рівні окремих генів чи їх груп. В основі цих методів лежить використання поліморфізму ДНК для виявлення її специфічних послідовностей. ДНК-діагностика (генна діагностика) дає змогу, з одного боку, управляти генетичною структурою популяції, з іншого – проводити аналіз генотипів тварин на рівні генів, які асоційовані з господарсько корисними ознаками. Такі локуси отримали назву локуси кількісних ознак, або QTL (Quantitative Trait Loci's) [15, 16]. Так, за номенклатурою молочні білки кодуються: 8  $\alpha$ 1-CN (A, B, C, D, E, F, G, H), 4  $\alpha$ 2-CN (A, B, C, D), 12  $\beta$ -CN (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I), 11  $\kappa$ -CN (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J), 11  $\beta$ -LG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W) і 3  $\alpha$ -LA (A, B, C) [14]. Упродовж останніх років бета-казеїн молока ретельно вивчається щодо його можливого впливу в деяких незаразних розладах. Науковці поділяють його на два типи – A1 і A2. Під час перетравлення молока A1 виробляється пептид бета-казоморфін-7 (BCM-7), який, як вважають, сприяє розвитку аутизму, шизофренії та інших неінфекційних захворювань. Екологічні дослідження, проведені у дев'ятнадцяти країнах (Великобританія, Фінляндія, Ірландія, Швеція, Данія, Франція, Німеччина, Ісландія, Норвегія, Австрія, Швейцарія, США, Японія, Ізраїль, Австралія, Нова Зеландія, Угорщина, Венесуела та Канада), виявили позитивний зв'язок між споживанням  $\beta$ -казеїну A1 та захворюваністю на цукровий діабет 1-го типу. Частота алеля A2 у худоби різних порід суттєво різниться. Так, у гернзейської, швіцької, джерсейської, голштинської, айрширської та червоної данської вона становить 96–98 %, 66–70 %, 50–63 %, 44–53 %, 40–49 % та 23 % відповідно. У Новій Зеландії наявність у молоці бета-казеїну A1, як небажаного варіанта, зумовила здійснення добору молочних корів, залежно від поліморфізму за цією ознакою. У програмах розведення як основний критерій було закладено

використання бугаїв з генотипом A2A2. Нині популяція худоби цієї країни продукує молоко лише з варіантом A2 за бета-казеїном [18]. Гени молочного білка, особливо капа-казеїн (CSN3), є важливими чинниками якості та зсідання молока. Капа-казеїн – єдина фракція основного білка молока, що містить амінокислоти цистеїн і метіонін, і становить приблизно 13 % казеїну молока. Виявлено одинадцять алелів, з яких найбільш поширеними є A, B і E. Для успішної селекції за ознакою сиропридатності використовують показник генотипу тварин за капа-казеїном. Найбільшою сиропридатністю вирізняється молоко тварин, що мають генотип BB (гомозиготні), меншою мірою – молоко корів, що мають генотипи AA і AB. Молоко від корів з генотипом BB має достовірно вищий відсоток білка і здатність до утворення згустку. Частота алелів капа-казеїну у худоби залежить від її породної належності. Варіант B переважає у симентальських тварин (69,6 %), тимчасом частота κ-CN алелю A є більшою у шведської червоно-рябої худоби (62,5 %) [23]. Корови джерсейської породи різнилися від корів червоної шведської та голштинів данської селекції високою частотою B-варіанта капа-казеїну та відсутністю алельного варіанта E. У червоної шведської та голштинської порід варіант κ-CN A був найбільш поширеним, тимчасом алель E κ-CN зустрічався частіше у червоної шведської, ніж у голштинської. У тварин сірої української породи спостерігалася низька частота алеля B (0,337). Частоти генотипів AA та AB становили 0,456 та 0,413 відповідно. Лише шість тварин виявилися носіями гомозиготного генотипу BB (0,13). Найбажанішим для виробництва молочних продуктів вважається комплексний генотип A2A2BB, що здатен забезпечити здоров'я людини і високі технологічні якості молока. Згідно з даними науковців, найбільша частота комплексного генотипу у корів голштинської породи характерна для A1A2AA – 36,4 %. Генотипи A1A2AB та A2A2AA зустрічалися відповідно у 14,9 та 17,5 % поголів'я, а A1A2AB – у 11,4 %. Для червоної шведської комплексні генотипи β-κ-CN суттєво впливали на співвідношення та концентрацію основних білків.

Комплексний генотип А2А2/АА був найпоширенішим у тварин симентальської породи. (1).

**Мета і завдання роботи.** Визначити характеристику стада ВРХ за поліморфізмом гену капа-казеїну.

Для досягнення мети сформульовано наступні завдання:

- визначити генотип тварин за геном капа-казеїну;
- вивчити протокол проведення ПЛР-ПДРФ для охарактеризування стада за поліморфізму гену капа-казеїну;
- визначити кореляцію між алелями капа-казеїну та якостями молока;
- дослідити як алелі капа-казеїну впливають на молочну продуктивність корів.

*Предмет досліджень* – генетико-популяційні параметри дослідної групи корів, частоти генотипів й алелів виявлених поліморфних локусів у популяції корів голштинської та чорно-рябої молочної породи, параметри надою тварин за дві лактації.

*Об'єкт досліджень* – поліморфізм гена капа-казеїну та молочна продуктивність корів з різними генотипами за алелями капа-казеїну.

*Методи дослідження:* *молекулярно-генетичні* – виділення ДНК, проведення ампліфікації, рестрикції та електрофорезу дослідних фрагментів, *зоотехнічні* – визначення показників молочної продуктивності ВРХ (стандартний надій за двома лактаціями); *статистичні* – загальноприйняті параметричні (дисперсійний аналіз) і непараметричні (U-критерій Манна-Уїтні, критерій Краскела-Уоліса) методи порівняння вибірок, дескриптивна статистика.

**Теоретична цінність отриманих результатів.** За результатами проведених досліджень було встановлено частоту алелю А який асоційований із підвищенням надою значно вища ніж алель В. Визначено оптимальні параметри для електрофоретичного розділення ампліфікованих фрагментів ДНК в агарозному

гелі. Доведено, що для ефективної ампліфікації потрібно використовували температуру відпалу праймерів на матриці ДНК у межах 61-64°C впродовж 30 с в кожному циклі. Для ефективного розділення продуктів ампліфікації фрагменту поліморфізму гену капа-казеїну запропоновано використання 1,5 %-ого агарозного гелю впродовж 30 хв при напрузі у 120 V.

На основі оптимізованих алгоритмів проведено індивідуальне типування особин корів голштинської породи, визначено особливості генетичної структури дослідної популяції за поліморфізмом локусу капа-казеїну.

**Прикладна значущість.** Завдяки протоколу ампліфікації та рестрикції поліморфізму гену капа-казеїну за використання методу ПЛР-ПДРФ можна ефективно використовувати для проведення індивідуального типування тварин. Разом із цим наявні й інші матеріали про те, що найбільш цінним за виходом якісного сиру було також молоко корів із генотипом CSN3BB на 11,1 %, порівняно з продукцією, виготовленою з молока тварин із генотипом CSN3AA. Аналогічної думки додержується, який також пов'язує збільшення вмісту білка, підвищення виходу щільного згустку і зменшення тривалості зсідання молока під дією сичужного ферменту з наявністю у корів із генотипом CSN3BB. Результати досліджень повністю узгоджуються з даними попереднього науковця. Досліджуючи результати можна виявити, що за допомогою методу ПЛР-ПДРФ можна ефективно здійснювати селекцію за асоціацією із генетичними маркерами. І якнайбільше це відноситься до тварин із генотипом CSN3BB. У рамках проведеної генетичної оцінки молока автори виявили важливу обставину, що принаймні у 85,7 % корів із генотипом BB за локусом капа-казеїну воно зсідалося за 15–40 хв, у вибірці тварин із генотипом CSN3AB питома частка яких становила 6,6 %, генотипом CSN3AA – 93,4 %.

**Особистий внесок.** Магістрантом проведено лабораторні дослідження; опановано методичні підходи; отримані результати досліджень, відібрано і проаналізовано літературні джерела; сформульовані висновки.

**Структура та обсяг роботи.** Магістерська робота складається із перелік умовних позначень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результати дослідження, висновки, списку використаних літературних джерел та пропозицій виробництву. Магістерську роботу викладено на 67 сторінках комп'ютерного тексту, що містить 5 рисунки та 5 таблиць. Список використаної літератури налічує 53 джерел.

## РОЗДІЛ 1

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ

#### 1.1. Характеристика гену капа-казеїну

**Казеїни** – це групи гетерогенних фосфопротеїдів, що самоасоціюються у міцели у присутності кальцію, цитратів та фосфатів. З казеїнових фракцій білків молока найбільший інтерес становлять:  $\alpha$ 1-казеїн,  $\beta$ -казеїн та  $\kappa$ -казеїн.  $\kappa$ казеїн займає особливе місце серед складових частин казеїну. За синтез  $\kappa$ казеїну у ВРХ відповідає ген капа-казеїну (CSN3). Нині виявлення алельних варіантів гена CSN3, саме: A, B1, B2, B3, D, E, F1, F2, G1, G2, H, I та ін., при цьому найбільш поширеними алелями є алельні варіанти A і B [9]. Огляд сучасних джерел свідчить про те, що вивченню поліморфізму гена капа-казеїну у молочних порід ВРХ приділяється велика увага [10-11]. У той самий час роботи з вивчення поліморфізму гена капа-казеїну у м'ясних порід нечисленні. У зв'язку з тим, що різні алелі даного гена по-різному впливають на показники надою та білка в молоці, цікаво було б виявити, чи існує вплив різних алелей гена капа-казеїну батьків на показники приросту потомства м'ясних порід. Однак такі роботи раніше не проводилися, що і послужило метою нашого дослідження. Іншим цікавим питанням було вивчення зміни частоти алелей гену капаказеїну у популяції породи шароле ВРХ за певний період часу, тому що такі дослідження не відомі, хоча молекулярні маркери (в тому числі структурних генів) набувають значну роль при вивченні динаміки популяцій сільськогосподарських тварин, що може мати не лише теоретичне, але і практичне значення в зв'язку з моніторингом зберігання рідких алелей в генофонді ВРХ. (2)

У контексті вказаного обґрунтовано наполягають на тому, що для корів із генотипом CSN3BB притаманна надшвидка коагуляція білків, порівняно з

тваринами з генотипом CSN3AA [11], міцний згусток, що легко віддає сироватку, а виготовлений сир відрізняється кращими органолептичними показниками, тоді як тваринам гетерозиготного генотипу CSN3AB властиві вищі технологічні характеристики молока: білковомолочність і коагуляційні властивості. Звісно тому низка країн Євросоюзу за розробки селекційних програм розведення молочної худоби включила ідентифікацію тварин за геном капа-казеїну до обов'язкової процедури її оцінки. (3)

За своїми властивостями всі білки молока можна поділити на дві групи: 82 % складають казеїни ( $\alpha$ S1-,  $\alpha$ S2-,  $\beta$ -,  $\kappa$ -казеїни) і 18% – сироваткові білки ( $\alpha$ - і  $\beta$ -лактоглобуліни) [12]. Алелі, що детермінують синтез білків молока, успадковуються кодомінантно та чітко діагностуються за використання молекулярногенетичних методів. Переважна більшість досліджень стосується двох найбільш економічно значимих генів – бета-лактоглобуліну ( $\beta$ -LG) і капа-казеїну ( $\kappa$ -казеїн, CSN3,  $\kappa$ -CN), поліморфізм яких пов'язаний з молочною продуктивністю. Відомо 13 генетично обумовлених алельних варіантів гена  $\beta$ -LG [13], серед яких алель А асоціюється з більшою концентрацією лактоглобуліну в молоці. Казеїни є основним джерелом амінокислот для молодого організму та задіяні в транспортуванні відповідної кількості фосфору і кальцію в молоці, необхідних для формування кісткової тканини. На відміну від інших трьох казеїнових білків, капа-казеїн за своїм амінокислотним складом подібний до фібрину та має властивість за результатами протеолізу формувати згустки [14]. Ця властивість досить давно використовується при виробництві сиру. На основі ДНК-аналізу екзонних ділянок гену CSN3 виявлено декілька нуклеотидних замін та поліморфні сайти рестрикції, описано 9 алельних варіантів (A, B, C, E, F, G, H, I і A1), серед яких найбільш поширені варіанти А та В [15, 16]. Відмінності між алелями А і В гену CSN3 обумовлені двома точковими мутаціями: амінокислотної заміни треоніну на ізолейцин у положенні 136 поліпептидного ланцюга та аспарагінової кислоти на аланін у положенні 148 [16]. Вважається, що молоко яке

містить варіант CSN3 В має кращі технологічні характеристики переробки, більший вміст жиру в сирі та його вихід [15]. Генотип CSN3 ВВ є найбажанішим для формування поголів'я корів, молоко яких використовується при виробництві твердих сирів. Варіабельність частот генотипів CSN3 зумовлена породною належністю з одного боку та селекційною спрямованістю з іншого. Так, наприклад, у буйволів цей ген мономорфний за алелем В, а от в процесі голштинизації локальних порід частка його знижується [17, 18]. Останнім часом в країнах з розвиненим тваринництвом все більше уваги приділяється  $\beta$ -казеїновій фракції білка (CSN2). Відомо близько 60 одонуклеотидних мутацій (SNP) в екзонній частині гену та 12 алельних варіантів CSN2 серед яких найбільш використовуваними в промисловому тваринництві є алелі А 1 і А 2 [19]. Мова йде про місенс мутацію С/А (rs:43703011) в 7 екзоні, яка призводить до зміни амінокислоти проліну (А 2) на гістидин (А 1). Продуктами цих алелів є так зване А 1 і А 2 молоко [20]. Ці білки бета-казеїну відрізняються однією амінокислотою, яка є причиною утворення у травному тракті людини бета-казоморфіну (у випадку з типом бета-казеїну А 1), що й викликає низку патологічних ефектів. У свою чергу, використання А 2 молока суттєво зменшує гострі симптоми неперетравлення коров'ячого молока. Продукція на основі А 2 молока поступово поширюється на ринках таких країн як Нова Зеландія (2000), Австралія (2004), США (2003), Великобританія (2011), Китай (2013). В останні роки, деяка зацікавленість стала з'являтися і серед наших вітчизняних господарств щодо типування корів за алелями  $\beta$ -казеїну [1]. Слід зазначити, що чотири гени казеїнів ( $\alpha$ S1-CN,  $\alpha$ S2-CN,  $\beta$ -CN, k-CN) тісно пов'язані та організовані на 6-й хромосомі *B. taurus* (200-250 кб) в порядку:  $\alpha$ S1,  $\beta$ ,  $\alpha$ S2 і k [16, 21]. Це робить дану конструкцію цікавою з точки зору дослідження нерівноважного зв'язку алельних варіантів цих генів. Гени  $\alpha$ S1-,  $\beta$ - і  $\alpha$ S2-казеїна найбільш тісно зчеплені і утворюють кластер на основі спільного еволюційного походження, тоді як ген k-CN віддалений від них не менш ніж 70 т.п.н. [5]. У цьому випадку інтерес виникає не тільки до

поліморфізму окремих генів (наприклад – капа-казеїну), але й і до необхідності аналізу комплексних генотипів та гаплотипів обох перспективних локусів – бета- та капа-казеїнів. Загалом, у вітчизняній науковій літературі зустрічаються роботи, які присвячені аналізу комплексних генотипів обох генів. Однак, не дивлячись на всю їх актуальність, у них простежується суттєвий недолік – відсутність аналізу нерівноваги за зчепленням (Linkage Disequilibrium, LD) за використання відповідного аналітичного інструментарію, що призводить до суттєвого обмеження ефективності досліджень, внаслідок того, що гаплотипи розглядаються в якості простих комплексних генотипів. (4).

## **1.2. Характеристика молока за різними алелями капа-казеїну.**

У процесі опрацювання результатів встановлено, що в молоці корів із генотипом ВВ виявилося більше загального білка на 0,41 і 0,28 %, масової частки білка (Pro. Total) – на 0,37 і 0,25 %, за вірогідної переваги щодо вмісту протеїну (казеїну) – на 0,46 і 0,29 % ( $p \leq 0,001$ ) та сумарної кількості казеїну і глобуліну – на 0,39 і 0,27 % ( $p \leq 0,001$ ) відповідно проти аналогів із генотипами АА і АВ. Натомість молоко корів із генотипом АА мало гіршу якість проти тварин із генотипами АВ і ВВ завдяки підвищеного вмісту нітрогену (казеїну) на 0,02 і 0,05 % ( $p \leq 0,05$ ), нітрогену (глобуліну) – 0,02 і 0,04 % ( $p \leq 0,05$ ) та небілого азоту – на 0,001 і 0,006 % ( $p \leq 0,05$ ). Не дивлячись на незначне відставання корів із генотипом АВ від тварин із генотипом ВВ за окремими білковими компонентами молока вони також були кращі за корів із генотипом АА за сумарним вмістом казеїну і глобуліну на 0,12 % ( $p \leq 0,05$ ). Міжгрупові відмінності за кількістю інших складових у молоці були не істотними і за статистичного опрацювання результатів виявилися невірними. В об'єктивній оцінці молочної продуктивності корів різних генотипів за локусом капа-казеїну значне місце займало визначення

хімічного складу та фізико-хімічних властивостей молока від яких природно залежав вихід продуктів його перероблення (табл. 2).

Наведені у таблиці дані свідчать про наявність відмінностей за хімічним складом та фізико-хімічними властивостями молока між коровами різних генотипів за локусом капа-казеїну. Скажімо, розбіжність за масовими частками лактози і сухої речовини в молоці між коровами з генотипом ВВ та АА і АВ виявилася доволі виразнішою і високо статистично значущою, ніж решта параметрів його оцінки: відповідно 0,16 % ( $p \leq 0,001$ ) і 0,11 % ( $p \leq 0,01$ ) та 0,65 % ( $p \leq 0,001$ ) і 0,37 % ( $p \leq 0,01$ ). У молоці цих тварин мав місце й більший, проти останніх, рівень масової частки сухого знежиреного молочного залишку відповідно на 0,44 % ( $p \leq 0,05$ ) і 0,32 %.

Загалом молоко корів із різними генотипами капа-казеїну є придатним до вироблення сиру, так як співвідношення основних компонентів є оптимальним:

масових часток жиру до сухого знежиреного залишку молока 0,42–0,43: 1,  
масових часток білка до сухого знежиреного залишку молока – 0,34–0,37: 1.

Таблиця 2

**Поживна цінність та фізико-хімічні властивості молока корів з різними генотипами капа-казеїну, (M±m)**

Показник	Генотип капа-казеїну		
	AA	AB	BB
Масові частки, %:			
лактози	4,86±0,01	4,91±0,02	5,02±0,03 <sup>###/00</sup>
сухої речовини	12,92±0,05	13,20±0,08 <sup>##</sup>	13,57±0,08 <sup>###/00</sup>
СЗМЗ	9,12±0,04	9,24±0,09	9,56±0,18 <sup>#</sup>
Точка замерзання, °C	-0,553±0,00	-0,552±0,00	-0,551±0,00
Густина, кг/м <sup>3</sup>	1028,04±0,16	1028,31±0,13	1028,45±0,07 <sup>#</sup>
Вміст соматичних клітин, тис/см <sup>3</sup>	405,33±51,48	355,92±39,06	253,73±39,22 <sup>#</sup>
Титрована кислотність, °T	17,58±0,10	17,75±0,11	17,89±0,07
Активна кислотність, од. рН	6,71±0,00 <sup>**/</sup> <sup>***</sup>	6,68±0,01	6,66±0,01
Енергетична цінність молока, ккал			
МДж	65,08±0,47	66,97±0,66 <sup>#</sup>	69,16±0,79 <sup>###/0</sup>
Співвідношення: жир : СЗМЗ	0,42 : 1	0,43 : 1	0,42 : 1
білок : СЗМЗ	0,34 : 1	0,35 : 1	0,37 : 1

*Примітка. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 – вірогідність різниці розрахована щодо корів із генотипом BB та AB; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 – щодо корів із генотипом AA; 00p<0,01 – щодо корів із генотипом AB*

Підвищення масових часток білка, жиру та лактози в молоці корів із генотипом BB відбилося на кінцевому зростанні його енергетичної цінності і відмінність щодо тварин із генотипом AA становила 17,07 МДж або 6,3 % (p<0,001) та особин із генотипом AB – 9,17 МДж або 3,3 % (p<0,05). Паралельно з цим, не менш цінним за масовою часткою сухої речовини, було молоко корів із генотипом AB, в яких збільшення вказаного показника проти тварин із генотипом AA перебувало на рівні 7,90 МДж або 2,9 % за статистично вірогідної різниці між ними (p<0,05). Варто зазначити, що за лабораторної оцінки якості молока в корів усіх груп відмічено однакову закономірність, за якої можна стверджувати про його відповідність вимогам ДСТУ 7671:2014 «Молоко коров'яче. Визначення точки замерзання кондуктометричним методом (експрес-метод)» і ДСТУ 6082:2009 «Молоко та молочні продукти. Методи визначання густини», так як

маркерні критерії натуральності за фальсифікації його водою, були практично незмінними і не виходили за межі допустимих норм та становили мінус 0,551 – мінус 0,553°C і 1028,04 – 1028,45 кг/м<sup>3</sup>. Опираючись на принципово важливому питанні з приводу того, що безпека і санітарна якість молока як продукту харчування людини останнім часом набувають все більшої актуальності, дослідили рівень соматичних клітин в молоці корів піддослідних груп. Відмітною особливістю молока корів із генотипом ВВ є зменшення вмісту цієї складової порівняно з молоком корів із генотипом АА на 151,6 тис/см<sup>3</sup> або 37,4 % ( $p \leq 0,05$ ) і генотипом АВ – на 102,2 тис/см<sup>3</sup> або 28,7 %. Подібна тенденція була властива коровам із генотипом АВ, в яких спостерігалось менш виразне зростання зараження молока соматичними клітинами на відміну від тварин із генотипом АА на 49,4 тис/см<sup>3</sup> або 12,2 %. Помітно є те, що ці зміни в середніх зразках молока більшості корів усіх піддослідних груп, зрештою, не порушували за межі допустимого вмісту соматичних клітин, згідно з ДСТУ 7672:2014 «Молоко коров'яче. Визначення кількості соматичних клітин методом проточної цитометрії (експрес-метод)», і констатують про відсутність захворювання на мастит. Причому, якщо частка зразків, що перевищували допустиме значення вмісту соматичних клітин у молоці (400 тис/см<sup>3</sup>) серед групи корів із генотипом АА становила 19 голів або 29,3 %, то поміж тварин із генотипом АВ – 5 голів або 16,7 % та ВВ – лише 1 голова або 20,0 % від загальної їх кількості. На тлі погіршення показників якості молока в корів із генотипом АА відбулося вірогідне підвищення в ньому рівня титрованої кислотності й концентрації вільних іонів водню ( $p \leq 0,01$  –  $p \leq 0,001$ ) проти особин із генотипами АВ і ВВ. Проте в цілому за водневим показником рН молоко корів усіх груп мало слабокисле середовище, значення якого коливалися від 6,66 од. рН у корів із генотипом ВВ до 6,71 од. рН – у тварин із генотипом АА.

**Висновки:**

1. Встановлено, що молоко корів української чорно-рябої молочної породи із генотипом ВВ характеризується вищою білковою якістю, зумовлюючи кращу поживну цінність.

2. Відмінності між піддослідними групами корів за хімічним складом та фізико-хімічними властивостями молока свідчать про генетичну їх обумовленість.

При цьому, молоко тварин із генотипом ВВ за локусом капа-казеїну характеризувалось як підвищеним вмістом основних компонентів, так і поліпшеною його якістю, ніж корів із генотипами АА і АВ. (8) У процесі опрацювання результатів встановлено, що в молоці корів із генотипом ВВ містилося більше загального білка на 0,41 і 0,28 %, масової частки білка (Pro. Total) – на 0,37 і 0,25 %, за вірогідної переваги щодо вмісту протеїну (казеїну) – на 0,46 і 0,29 % ( $p < 0,001$ ) та сумарної кількості казеїну і глобуліну – на 0,39 і 0,27 % ( $p < 0,001$ ) відповідно проти особин із генотипами АА і АВ. Натомість молоко корів із генотипом АА мало гіршу якість проти тварин із генотипами АВ і ВВ за рахунок підвищеного вмісту нітрогену (казеїну) на 0,02 і 0,05 % ( $p < 0,05$ ), нітрогену (глобуліну) – 0,02 і 0,04 ( $p < 0,05$ ) та небілкового азоту – на 0,001 і 0,006 % ( $p < 0,05$ ). Не дивлячись на незначне відставання корів із генотипом АВ від тварин із генотипом ВВ за окремими білковими компонентами молока, вони також перевершували корів із генотипом АА за сумарним вмістом казеїну і глобуліну на 0,12 % ( $p < 0,05$ ). Міжгрупові відміни за кількістю інших складових у молоці були не істотними і за статистичного опрацювання результатів виявилися невірогідними. Таким чином, молоко корів із генотипом ВВ характеризується вищою білковою якістю, яка зумовлює кращу поживну цінність.

### 3.3 Параметри молочної продуктивності та якість молока корів із різними генотипами капа-казеїну

#### 3.3.1 Рівень надоїв молока. Рівень молочної продуктивності, поряд із іншими основними господарсько-корисними ознаками, цілком природно

зумовлюється породною належністю та генотипом тварин. Про зв'язок між генотипами за локусом капа-казеїну і кількісними та якісними показниками молочної продуктивності дає уявлення табл. 3.3.

Таблиця 3.3

**Молочна продуктивність та якість молока корів з різними генотипами капа-казеїну, (M±m)**

Показник	Генотип капа-казеїну		
	AA	AB	BB
Кількість тварин, голів	60	30	5
Надій молока за 305 діб лактації, кг	6357,6±120,80*	6153,1±135,60	5934,8±141,30
Надій молока у перерахунку на базисну жирність (3,4 %), кг	7105,6±172,94	7166,5±169,24	6999,6±279,0
Масова частка в молоці жиру, %	3,80±0,05	3,96±0,05 <sup>#</sup>	4,01±0,08 <sup>#</sup>
білка, %	3,14±0,03	3,23±0,10	3,56±0,14 <sup>##</sup>
Кількість молочного жиру, кг	241,59±5,88	243,66±5,75	237,99±9,49
білка, кг	199,63±4,57	198,75±7,65	211,28±10,83
Співвідношення масових часток білок : жир	0,83:1	0,82:1	0,89:1

Примітка. \* $p < 0,05$  – вірогідність різниці розраховано щодо корів із генотипом BB та <sup>#</sup> $p < 0,05$ , <sup>##</sup> $p < 0,01$  – щодо корів із генотипом AA

Аналіз наведених у таблиці даних дає привід констатувати, що найвищими надоями характеризувалися корови з генотипом капа-казеїну AA, близькими до перших були тварини з генотипом AB і мінімальні надой властиві особинам із генотипом BB, що зумовлено незначною варіабельністю надоїв молока й чисельністю вибірки останнього генотипу. Від корів, які виявилися носіями генотипу AA за 305 діб лактації, отримано молока на 204,5 кг або 3,3 % більше, ніж від корів із генотипом AB, тоді як відмінність між ними і коровами з генотипом BB була значно більшою на 422,8 кг або 7,1 % за статистично вірогідної різниці між ними  $p < 0,05$  на користь тварин із генотипом AA. У корів із генотипом BB молочна продуктивність знизилась не лише до тварин із генотипом AA, але й порівняно з особинами носіями генотипу AB на 218,3 кг або 3,5 %, без

статистично вірогідної відмінності між ними. За переведення рівня надоїв молока на базисну жирність корови з генотипом АА домінували за цим показником над тваринами генотипів АВ лише на 60,9 кг або 0,9 % і ВВ – на 106,0 кг або 1,6 %. Проте дещо іншу закономірність виявлено за показниками молочності. Зокрема, молоко кращої якості з підвищеною на 0,21 % ( $p < 0,05$ ) масовою часткою жиру продукували корови з генотипом ВВ проти тих, які були носіями генотипу АА, хоча статистична значущість міжгрупової відмінності щодо масової частки білка виявилась суттєво вищою – на 0,42 % ( $p < 0,01$ ) на користь перших. Зв'язок генотипу корів за геном капа-казеїну з масовою часткою білка в молоці у тварин із генотипом АВ проти АА виражався меншою мірою (0,09 %), ніж жиру, за яким виявлена між ними відмінність на 0,16 % була також статистично вірогідною на користь перших ( $p < 0,05$ ). Помітні коливання рівня молочної продуктивності та якісного складу молока за рахунок зростання масової частки білка в сухій речовині продукції, одержаній від корів із генотипом ВВ призвели до зростання кількості молочного білка на 11,65 кг або 5,8 % щодо представниць із генотипом АА і на 12,53 кг або 6,3 % – проти особин із генотипом АВ. Проте, виявлена відмінність за цими показниками не набула статистичної значущості в жодній із груп. Водночас для виробництва якісного сиру ключове значення має не лише наявний вміст основних складових молока, але й їх співвідношення. Зокрема, амплітуда коливань співвідношення масової частки білка на одиницю жиру в молоці корів усіх груп незначно розширювалась у бік вмісту жиру: на одну частину жиру припадало в середньому близько 0,83–0,89 частин білка, що вказує на високу придатність молока до сироваріння. Незначне підвищення показників співвідношення масової частки жиру до білка в молоці тварин із генотипами АВ і ВВ певною мірою пов'язано зі зменшенням масової частки білка за одночасного збільшення масової частки жиру. Таким чином, тварини, гомозиготні за генотипом АА капа-казеїну, за рівнем надою молока за 305 діб лактації перевершували особин із генотипом ВВ і АВ. Однак, не дивлячись на міжгрупову

диференціацію за молочною продуктивністю, вищий рівень масових часток білка і жиру був властивий коровам з генотипом АВ та ВВ проти тварин із генотипом АА, що є свідченням кращої якості їх молока та придатності для виробництва сиру. Обумовленість молочної продуктивності та якості молока білковим складом і генотипами капа-казеїну Молоко та продукти його перероблення є невід’ємними частинами споживчого попиту національного ринку та сировиною для багатьох галузей харчової промисловості. Зростаюче значення цих продуктів харчування вимагає необхідності підвищення молочної продуктивності корів і поліпшення сиропридатності як пріоритетних питань, що традиційно лежать у площині фундаментальних завдань галузі скотарства та вирішуються не лише науковцями України, але й країн усього світу. Проблема покращення якості молока займає чільне місце в системі раціонального його виробництва і використання. Зважаючи на це, в останні десять років зроблено важливий прогностичний крок у поглибленні досліджень складу молока, що значною мірою пов’язано з розробкою більш досконалих і точних методів оцінки. Сьогодні у світовому науковому співтоваристві добре відомо, що білки – найцінніші компоненти молока. Досліджуючи специфічний профіль білків молока, деякі автори виокремили серед них три якісно різні фракції, що відрізняються одна від одної різноманітністю будови, відмінними фізико-хімічними властивостями, специфічними технологічними та біологічними функціями:

– казеїн ( $\alpha$ S1-казеїн,  $\alpha$ S2-казеїн,  $\beta$ -казеїн,  $\kappa$ -казеїн), кількість якого становить 75–85 % у загальній архітектоніці білків молока, із молекулярною масою 19000–25000 Да;

– сироваткові білки:

а) лактоглобулін із молекулярною масою 18000 Да;

б) лактоальбумін – 14000 Да;

в) імуноглобулін, альбумін сироватки крові (лактоферин) – 76000 Да;

г) протеазо-пептони та мінорні білки або білки мембран – 60000 Да, питома частка яких становить 15–22 %;

д) білки оболонки жирових кульок із молекулярною масою 60000 Да, число яких наближається до 1% у загальній структурі білків молока.

Однак, важко погодитися з твердженнями, які дискутуючи розрізнили серед молочних білків лише дві фракції: казеїн та сироваткові білки. Фракції білка молока виконують різноспрямовані функції:

казеїн – транспортну;

лактоальбумін – регуляторну;

лактоглобулін, лактоферин, імуноглобулін – захисну [ 22].

Зараз не випадково увага дослідників багатьох країн із розвиненим молочним скотарством прикута до пошуку методів підвищення вмісту білка в молоці. Для цього проводиться ефективна і тривала селекційно-плеємінна робота, заключна ціль якої полягає в розведенні тварин, здатних у конкретних виробничих умовах оплачувати спожиті корми найбільшим виходом високоякісної продукції [23]. За вимогами ДСТУ 3662-2018 «Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови», за базисними нормами вміст білка в молоці має бути 3,0 % [24]. Численними прикладами переконливо доведено, а практикою обґрунтовано, що рівень фракцій казеїну в молоці як найбільш інформативний у виробничому відношенні показник, передусім відображає процес сиропридатності та кількісний вихід сиру [25–27]. Його питома частка становить майже 75–80 % у загальній структурі білків і це єдина фракція, яка руйнується під дією сичужного ферменту. Після виділення з молока казеїну на сироваткові білки альбумін, глобулін та низькомолекулярні білки припадає лише 20–25 %. Утім, як стверджують, окремі фракції казеїну в

молоці присутні в широкому діапазоні числових значень:  $\alpha S1$  – 41,5 %;  $\alpha S2$  – 4,1 %;  $\beta$  – 27,9 %,  $k$  – 7,4 %,  $\gamma$  – 3,1 %. Слід додати, що вміст окремих фракцій казеїну в молоці ВРХ молочного напрямку продуктивності має породну специфічність, разом із цим суттєво різниться від генетичних особливостей кожної тварини [28]. Вміст казеїну в молоці значною мірою зумовлюється сезонами року, що тісно пов'язано, перш за все, зі змінами умов годівлі. Зокрема науковцями доведено, що найбільшу кількість  $\alpha S1$ -казеїну містить білок молока влітку та восени, між тим як найменше міститься його у весняному молоці. Значну кількість фракції  $\alpha S2$ -казеїну виявлено в молоці, отриманому в березні-травні, однак менший її вміст властивий осінньому та зимовому молоку. Мінімальна кількість фракції  $\beta$ -казеїну характерна білкам молока весняного періоду, максимальна – прохолодним місяцям року. Фракція  $k$ -казеїну навесні зменшується до найнижчих величин, а влітку – набуває найвищих значень. Кількісний склад сироваткових білків також залежить від річного ритму, із сезонною циклічністю величин від 14,7 % до 26,9 %. Факт сезонної варіабельності вмісту сироваткових білків відмічають [28]. Автори публікацій зауважують, що зазвичай їх питома частка дуже відчутно зростає в березні-травні, проте в червні-липні - знижується. Натомість єдина думка щодо цього питання відсутня. Не можна знехтувати і ґрунтовні дослідження [29], який в умовах північно-східного регіону України виявив фракційний склад білків молока та його сиропридатність у корів новостворених української бурої молочної і сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної порід.

Серед результатів вчених, які вивчали проблему якісної оцінки білкового складу молока включно найбільш вагомим варто віднести роботи [30–33]. Високу ефективність використання корів швіцької породи і помісей лебединської та швіцької порід в умовах Сумської області України за виробництва твердого сичужного сиру вищої якості доведено [34]. Вміст білка в молоці та його

структура, крім усього іншого, беззаперечно мають провідне економічне і технологічне значення. Вони позначаються на витратах сировини, часу, енергії за виробництва молочних продуктів і сирів. Із підвищенням вмісту білка в молоці збільшується вміст кальцію і фосфору, зростає титрована кислотність, посилюється сичужне зсідання, покращується щільність і здатність згустку до синерезису, зменшуються кількість сирного пилу, втрати білка і жиру, тобто майже всі фізико-хімічні показники [29]. Суттєво відзначити те, що фізико-хімічний склад та біологічні властивості молока визначають його сиропридатність, від якої залежать тривалість зсідання і щільність згустку. За сиропридатністю молоко поділяють на три типи:

1 – молоко зсідається під дією сичужного ферменту до 10 хв, воно має щільний однорідний згусток, із якого швидко відшаровується сироватка;

2 – молоко зсідається до 15 хв із специфічним однорідним згустком, що легко віддає сироватку;

3 – молоко зсідається упродовж 15–20 хв із утворенням нещільного згустку, а іноді зі слабким відшаровуванням сироватки.

Із зарубіжної практики відомо, що кількісне співвідношення цих підфракцій казеїну суттєво впливає на вихід сиру. При тому що сумарна питома частка  $\alpha$ S1- і  $\beta$ -підфракцій має становити на рівні не менше 91 %. Неможливо не враховувати позицію деяких дослідників щодо оцінки мінливості окремих технологічних характеристик сиру під впливом іншої підфракції казеїну – підвищення вмісту підфракції k-казеїну супроводжувалося зростанням на 8,7–16,5 % виходу сирної маси, у той час як тривалість зсідання молока, навпаки, зменшувалася. Водночас значну кількість роботи, пов'язану з більш розгорнутим розумінням механізмів формування білкового складу молока, було виконано лише завдяки новим можливостям впровадження у виробництво надчутливих молекулярногенетичних

методів, що дають змогу ідентифікувати поліморфізм генів і проводити подальшу селекцію в напрямі покращення білковомолочності та сиропридатності з урахуванням бажаних алелів. У цьому плані, використання молекулярно-генетичних методів за умов раннього прогнозування рівня й напряду продуктивності тварин, сприятиме прискоренню темпів селекційного прогресу на 50 % і дасть змогу одержати суттєвий економічний ефект. Про доцільність впровадження геномної селекції в племінну роботу з молочною худобою зазначають окремі зарубіжні автори [35– 37].

На сьогоднішній день у ВРХ різних порід виокремлено, але з різною частотою, 13 алелів гену капа-казеїну – А, В, С, D, E, F, G, H, I, X, Az, A(I), J, з яких найбільш ґрунтовно вивчено й верифіковано сім – А, В, С, E, F, G, H.

Ген капа-казеїну є найбільш дослідженим. Він відноситься до сіттенної групи U15 і локалізований на шостій хромосомі [38]. Розмір гену – 13,5 т.п.н., він складається з 5-и екзонів загальною довжиною 850 п.н і 4-х інтронів. Найчастіше стрівальними алелями є А і В, які різняться заміною двох амінокислот у позиції поліпептидного ланцюга: 136 треоніну (Thr) на ізолейцин (Iso) і 148 аспарагінової кислоти (Asp) на аланін (Ala) та викликані точковими мутаціями в позиціях 5309 (C/T) і 5345 (A/C) нуклеотидної послідовності четвертого екзону капа-казеїну, інші алелі є рідкісними для більшості порід ВРХ [128–133]. Теоретичні положення щодо оцінки молочних білків, їх генетичних варіантів й експериментальні аспекти виявлення залежності між ними та параметрами перебігу лактації, складом молока, виходом і якістю сиру висвітлено в наукових розробках багатьох закордонних учених [39–45]. Однак слід враховувати, що для виробництва сиру необхідне молоко з високими технологічними характеристиками, які обумовлюються генотипом корів [46-47]. Натомість, аналіз компетентних джерел літератури та накопичений досвід роботи вітчизняних молочних ферм і

комплексів свідчить про те, що ступінь реалізації спадкового потенціалу в тварин виявляється по-різному.

Схожа ситуація спостерігається й в інших країнах світу. Помічаючи генотипові особливості голштинської породи група закордонних дослідників звернула увагу на збільшення у корів частоти стрівальності алеля CSN3A проти алеля CSN3B. Зокрема, її величина в молочних стадах Канади становила 0,74, Сербії – 0,70 [48], Хорватії – 0,76 [49], Мексики – 0,79 [50], Туреччини – 0,82 [51], Палестини – 0,75–0,84 [52], між тим як схрещування цієї породи з породою зебу приводило донезначного зростання частоти алеля, а у помісей до 0,85 [53].

Опираючись на кількісну оцінку цих порід експерт підтвердили картину збільшення, серед протестованих, частоти стрівальності алеля А капа-казеїну, порівняно з масивом тварин, у яких було виділено алель В.

Аналогічні результати на коровах бестужевської і холмогорської молочних порід одержані. Зокрема, величини частот стрівальності алелів капа-казеїну А і В у популяцій цих тварин перебували на рівні відповідно 0,74–0,80 і 0,20–0,26. При тому, що іншими авторами було доведено майже відповідну закономірність щодо розподілу частот виявлених алелів капа-казеїну, що відмічалася серед масиву корів: 0,88 для алеля А і 0,12 – алеля В. Між тим, як у дослідної популяції червонорябої породи алель А виокремлювався з коливаннями величин від 0,40 до 0,78, а алель В – від 0,22 до 0,60. Наведені дані знаходяться в абсолютному протиріччі з висновками. За генетичного тестування бугаїв червоно-рябої породи дослідниками виявлено, що частота стрівальності алелів А і В у них була незначно вищою – відповідно 0,70 і 0,30.

Деякі автори дотримуються іншої думки – вони вказують, що в іранській популяції голштинів, навпаки, притаманна вища частота алеля В капа-казеїну – на рівні 0,41.

Водночас, окремі стада обмежуються наявністю лише двох генотипів. Упершу чергу це CSN3AA і CSN3AB. Це яскраво висвітлено в праці, де також іде мова про те, що серед дослідженого поголів'я високопродуктивних корів чорно-рябої породи автору вдалося ідентифікувати лише генотипи за локусом капа-казеїну – AA і AB, за величин частот стрівальності відповідно 93 і 7 %. Опираючись з концепцією інших іранських фахівців [50], частота генотипу CSN3AA у популяції голштинізованих корів перебувала на рівні 0,72, CSN3AB – 0,18 і CSN3BB – 0,10. На цьому фоні більшу зацікавленість привертає робота [51], які встановили схожу особливість розподілу частот генотипів серед вітчизняних порід ВРХ різного напрямку продуктивності. Включно, у масиві корів сірої української породи вони становили відповідно 0,46; 0,41 і 0,13, білоголової української – 0,63; 0,27 і 0,10 та голштинської – 0,71; 0,28 і 0,02.

Тож у кожній породи ВРХ частоти стрівальності алелі різні, але загалом частота алеля В CSN3 залишається досить низькою. На основі власних експериментальних здобутків переважна більшість фахівців змогли це підтвердити і дійти до одностайного висновку: одержані результати підкреслюють гостру необхідність проведення подальшої спрямованої селекційної роботи в напрямі виразного наростання в стадах поголів'я тварин із цим алелем, шляхом використання бугаїв-плідників із бажаним генотипом ВВ. Із метою виявлення зв'язку генотипу молочної худоби за локусом капа-казеїну з її молочною продуктивністю та якістю молока проведено численні науково-господарські досліді.

Однак неоднозначність поглядів щодо визначення яких з алелів А чи В є найкращим, викликає гострі дискусії. Розглянемо окремі з них.

За результатами моніторингу окремих джерел літератури встановлено, що генотип CSN3AA впливає на підвищенні надоїв, рівні жиру і білка в молоці, а

його стрівальність, зокрема в чорно-рябої молочної породи, знаходиться на рівні 68 % [49]. У науковій періодиці опубліковано низку відомостей й інших вчених [53] про наявність підвищення молочної продуктивності також у корів чорно-рябої породи з генотипом CSN3AA, у порівнянні з генотипом CSN3BB на 227,8 кг і генотипом CSN3AB – на 114,8 кг. Зі зростанням надоїв у корів відмінності за масовою часткою жиру в молоці по кожній із досліджених груп виявились незначними, а за вмістом масової частки білка кращими виділися корови з генотипом CSN3BB (3,68 %), які переважали тварин із генотипом CSN3AB на 0,15 % і ровесниць із генотипом CSN3AA – на 0,14 %. Здавалося б, що все вказує на ймовірну вигоду використання корів із генотипом CSN3AA для підвищення молочної продуктивності та CSN3BB – для поліпшення якості молока. Однак, існують й достатньо обґрунтовані інші наукові точки зору. Порівнюючи вплив генотипу на продукування молока корів білоруської чорно-рябої породи стверджує, що найбільший внесок у стимуляцію лактогенної діяльності, збільшенню жирномолочності та вмісту білка надали тварини з гетерозиготним генотипом CSN3AB, якщо порівнювати представниць із генотипами CSN3AA. До аналогічного висновку, на підставі власних напрацювань, дійшли й [52]. Своє бачення проблеми викладає у першоджерелі [53]. За результатами узагальненого аналізу, проведеного нею на масиві п'яти досліджених порід ВРХ, встановлено, що в межах червоної горбатовської породи за вмістом жиру в молоці тварини з генотипом CSN3AB переважану більшість представниць із генотипом CSN3AA на 0,12 %, хоча за виходом молочного жиру превалювали корови з генотипом капаказеїну BB – на 40,0 кг. Представниці ярославської породи, яким притаманний генотип CSN3BB, за вмістом білка в молоці перевищували особин із генотипом CSN3AB на 0,16 % і генотипом CSN3AA – на 0,12 %. За тестування червоно-рябої породи продуктивнішими виявились первістки з генотипом CSN3BB. За 305 діб лактації від них отримано на 424 кг більше молока, жиру – на 0,05 % і молочного жиру – на 33,7 кг, порівняно з ровесницями генотипу CSN3AA. У свою чергу,

відмінності між тваринами з генотипами капа-казеїну BB і AB за цими показниками становили відповідно 436 кг (0,02 %) і 14,7 кг [165].

Підвищення молочної продуктивності за лактацію в первісток залежно від генотипу відмічається й у досліді [180]. Зокрема науковець інформує про виразну перевагу тварин із генотипом CSN3BB за надоями молока на 72 кг, порівняно з ровесницями генотипу CSN3AA. Подібні зміни (+410 кг) помітно відзначалися й щодо представниць із генотипом CSN3AB, у той час як за жирністю молока стійкої залежності від генотипу не виявлено і тварини з генотипом CSN3BB поступалися особинам із генотипом CSN3AA на 0,01 % і генотипом CSN3AB – на 0,04 %, хоча незначні втрати жиру в молоці вони компенсували підвищеним вмістом молочного жиру, за величиною якого, навпаки, переважали інші групи – відповідно на 2,0 кг і 12,5 кг. Додатковим доповненням цих положень є дані, наведені в роботі, в якій дослідниця за опрацьованими матеріалами порівняльної оцінки молочної продуктивності корів першої лактації повідомляє, що надій матерів бугаїв червонорябої породи із генотипом CSN3BB був на 1408 кг вищий, на відміну від особин із генотипом CSN3AA, хоча кількість тварин у стаді, які успадкували генотип CSN3BB, виявилася невеликою.

В Україні питанню тестування ВРХ за генотипами капаказеїну до початку ХХІ століття не надавалось достатньої уваги. На цей час із наукових праць відомо, що найвища частота стривальності генотипу CSN3BB притаманна тваринам лебединської, сірої і білоголової українських молочних порід. Чимало й інших учених розділяють позицію стосовно позитивного функціонального зв'язку між частотою алеля В капа-казеїну в корів та їх молочною продуктивністю і якісним складом молока. Аналізом вивчення їх досвіду неодноразово підтверджено широкі можливості використання таких тварин для інтенсифікації галузі молочного скотарства.

Крім того, багато фахівців притримуються думки про те, що молоко корів із алелем В або генотипом CSN3BB асоціюється з покращенням технологічних властивостей виготовлених сирів і молочних продуктів, так як якість сиру цілком природно залежить від вмісту масової частки білка в молоці. У контексті вказаного [52, 11] обґрунтовано наполягають на тому, що для корів із генотипом CSN3BB притаманна надшвидка коагуляція білків, порівняно з тваринами з генотипом CSN3AA, міцний згусток, що легко віддає сироватку, а виготовлений сир відрізняється кращими органолептичними показниками, тоді як тваринам гетерозиготного генотипу CSN3AB властиві вищі технологічні характеристики молока: білковомолочність і коагуляційні властивості. Звісно тому низка країн Євросоюзу за розробки селекційних програм розведення молочної худоби включила ідентифікацію тварин за геном капа-казеїну до обов'язкової процедури її оцінки.

Всебічний і розширений спектр інформації з приводу цього питання було опубліковано у праці [45]. У процесі проведеної генетичної оцінки молока автори виявили важливу обставину, що принаймні у 85,7 % корів із генотипом ВВ за локусом капа-казеїну воно зсідалося за 15–40 хв, у вибірці тварин із генотипом CSN3AB питома частка яких становила 57,1 %, генотипом CSN3AA – 14,3 %. За рекомендаціями [52], для виробництва одного кілограма твердого сиру від корів із генотипом CSN3BB необхідно значно менше молока, ніж від інших генотипів. За наявності білка на рівні 2,83 % витрати молока на виготовлення сиру становили 12,4 кг, а якщо кількісний склад білків зростав до 3,0 %, то вони скорочувались до 11,2 кг.

Однак кількісні зміни білків молока справляють як позитивний, так і негативний вплив на технологічні властивості молока. Зокрема, вміст білка в молоці на рівні 2,4–2,6 % призводить до гіршого зсідання під дією сичужного ферменту, із нього утворюється в'ялий згусток або ж він зовсім не утворюється,

структура його не відповідає технологічному процесу, зростають втрати поживних речовин, призупиняється інтенсивність біохімічних процесів за дозрівання сиру, погіршуються органолептичні властивості, і як кінцевий результат – витрати молока за виробництва одного кілограма сиру збільшуються на 0,2–3,2 кг.

Зважаючи на це, як зауважують окремі науковці, для виробництва твердих сирів краще застосувати молоко з вмістом казеїну на рівні 2,71–2,80 % і білків сироватки – не більше 0,65 %. У своїй науковій праці аргументує [23], що максимальний рівень зрілості характерний сиру, виготовленому з молока корів генотипу CSN3BB, утім для молока корів із генотипом CSN3AA отримано гірший результат, за міжгрупової різниці 33,1 %.

У цьому автор статті вбачає посилену активізацію перебігу біохімічних процесів конкретно в молоці корів із генотипом CSN3AA, на відміну від послабленої реакції у тварин із генотипом CSN3BB. Разом із цим наявні й принципово інші матеріали про те, що більш цінним за виходом якісного сиру було також молоко корів із генотипом CSN3BB на 11,1 %, у порівнянні з продукцією, виготовленою з молока тварин із генотипом CSN3AA. Аналогічної думки додержується, який також пов'язує збільшення вмісту білка, підвищення виходу щільного згустку і зменшення тривалості зсідання молока під дією сичужного ферменту за наявністю у корів із генотипом CSN3BB. Результати досліджень [44] повністю узгоджуються з даними попереднього науковця. В цілому проведений авторами публікації аналіз отриманих результатів переконує в тому, що поліпшені технологічні властивості молока (підвищення сухого залишку і відсоткового вмісту жиру, зростання виходу і зменшення часу зсідання) обумовлюються генотипом корів за капа-казеїном. І якнайбільше це стосується тварин із генотипом CSN3BB. Із цього приводу зазначають, що молоко корів холмогорської породи татарстанського типу, в яких було виявлено алель В CSN3, мало найменшу тривалість коагуляції і найбільший вихід сичужного згустку, не

дивлячись на незначні недоліки за термостабільністю молока у тварин з алелем А CSN3.

Отож білковий склад молока має відмітні особливості, які варто враховувати за проведення селекційно-технологічних заходів стосовно його покращення. У той час питання розведення корів із бажаним генотипом за локусом капа-казеїну, пов'язаного з якістю та сиропридатністю молока, залишається відкритим і далеким від остаточного вирішення. Породні відмінності та внутрішньопородні коливання вітчизняної молочної худоби за цією ознакою вказують на потребу подальшого поглиблення роботи в напрямі більш широкого використання тварин носіїв генотипів АВ і ВВ капа-казеїну та підвищення придатності молока до виробництва сиру, що обумовлює актуальність такого дослідження. (5).

**Капа-казеїн** – один з небагатьох вивчених генів, однозначно зв'язаний з ознаками сиропридатності молока. Локус капа-казеїну відноситься до синтенної групи (наявність в хромосомах різних видів тварин одного або більше гомологічних генів)  $u15u15$  і знаходиться в хромосомі 6. Капа-казеїн – це фосфоглікопротеїн, який становить близько 12 % казеїнового комплексу. Кількість і тип капа-казеїну спадковозумовлені (їх генотипи позначають символами А, В, Е, F та інші).

Гени блоків молока відносять до ДНК-маркерів ВРХ. Всі молочні білки поділяють на дві основні групи: казеїн і білки сироватки. На долю казеїну припадає більше 80% всього молочного білка. Майже 17% становлять білки сироватки. До них відносять  $\alpha$ -лактоальбумін,  $\beta$ -лактоальбумін, а також імуноглобуліни і альбуміни сироватки. Гени К,-казеїнів  $\alpha s1\alpha s1$ ,  $\alpha s2\alpha s2$ ,  $\beta\beta$  локалізуються на хромосомі 6 у вигляді генного кластера і створюють одну групу зчеплення. Алель В капа – казеїну зумовлює підвищений вміст білка в молоці, кращі його коагуляційні властивості, підвищений вихід твердого сиру.

Казеїни містять повний набір незамінних амінокислот, багаті валіном (7%), лейцином (12%), лізином (17%). Популяції худоби вказані в порядку зменшення частот зустрічностей алелі капа-казеїну А та В (6). Крім того доведено, що навіть без спрямованої селекції на білковість саме молоко тварин цих порід в найбільшій мірі відповідає сучасним технологічним вимогам виробництва сирів високої якості.

Використовуючи метод ДНК-діагностики з'ясовано, що популяції цих тварин мають збільшену частоту алеля В CSN3, який корелює з більш високим вмістом загального протеїну в молоці, підвищеним вмістом капа-казеїну і має найкращі властивості для сироваріння. Запровадження ДНК-тестування дозволило б ідентифікувати тварин з підвищеною молочною продуктивністю та з кращою якістю молока і включати їх у селекційний процес, що забезпечило б формування стад тварин з високотехнологічними властивостями молока (7).

### **1.3. Амінокислотний склад білків молока.**

Порівнюючи одержані результати досліджень прослідковувалась чітка закономірність: зі збільшенням вмісту масової частки білка і сухого знежиреного залишку в молоці корів із генотипом ВВ як загальна сума амінокислот, так і амінокислотний індекс, зростали (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Амінокислотний склад білків молока корів із різними генотипами капа-казеїну, г/кг, (M±m, n = по 5 голів у кожній групі)

Найменування амінокислоти	Генотип капа-казеїну		
	AA	AB	BB
Лізин	2,25±0,10	2,28±0,07	2,57±0,09 <sup>o</sup>
Метіонін	0,67±0,03	0,70±0,04	0,79±0,04 <sup>o</sup>
Гістидин	0,70±0,04	0,79±0,07	0,89±0,06 <sup>o</sup>
Треонін	1,23±0,08	1,25±0,08	1,39±0,08
Ізолейцин	1,40±0,08	1,42±0,06	1,58±0,02 <sup>o</sup>
Лейцин	2,68±0,11	2,72±0,12	3,07±0,13
Фенілаланін	1,48±0,12	1,50±0,10	1,68±0,05
Сума незамінних амінокислот	10,42	10,66	11,97
Серин	1,58±0,06	1,58±0,06	1,78±0,09
Глутамінова кислота	5,83±0,12	6,05±0,15	6,83±0,18 <sup>oo</sup>
Пролін	3,17±0,18*	2,86±0,09	2,67±0,11
Гліцин	0,79±0,13	0,75±0,09	0,63±0,07
Аланін	0,99±0,08	0,88±0,01	0,83±0,03
Сума цистину і цистеїну	0,20±0,02	0,20±0,01	0,18±0,01
Аргінін	0,88±0,09	0,92±0,01	0,99±0,03 <sup>o</sup>
Аспарагінова кислота	2,08±0,09	2,19±0,02	2,48±0,17
Тирозин	1,14±0,07	1,17±0,08	1,29±0,09
Сума замінних амінокислот	16,66	16,60	17,58
Загальна сума амінокислот	27,08	27,26	29,55
у т.ч. незамінних, %	38,48	39,10	40,51
замінних, %	61,52	60,90	59,49
Амінокислотний індекс, %	62,5	64,3	68,1

Примітка. \*p<0,05 – вірогідність різниці розраховано щодо корів із генотипом BB; <sup>o</sup>p<0,05; <sup>oo</sup>p<0,01 – щодо корів із генотипом AA; <sup>o</sup>p<0,05 – щодо корів із генотипом AB

Лабораторними дослідженнями встановлено, що зростання загальної суми амінокислот у молоці корів із генотипом BB проти тварин із генотипом AA на 9,2 % відбувалося як наслідок помітного збільшення в їх складі незамінних – на 14,9 % та замінних – на 5,5 % амінокислот. Зараз, основний внесок у формування загальної суми незамінних амінокислот у білках молока корів із генотипом BB був забезпечений найбільшим вмістом лізину на 14,2 % (p<0,05), метіоніну – на 17,9 % (p<0,05), гістидину – на 27,1 % (p<0,05) та ізолейцину – на 12,9 % (p<0,05).

Примітно, що виявлена залежність характерна й у відношенні решти амінокислот, серед яких за вмістом треоніну, ізолейцину, лейцину і фенілаланіну різниця між цими групами є досить високою і коливалася від 12,9 % до 14,6 %, рівень різниці статистично позначився як тенденція.

Так само домінуючими незамінними амінокислотами у складі білків молока корів із генотипом АВ у відношенні представниць із генотипом АА були метіонін на 4,5 % та гістидин – на 12,9 %. На тлі збільшення вмісту цих амінокислот різниця, стосовно останніх за кількістю лізину, треоніну, ізолейцину, лейцину та фенілаланіну виявилась менш виразною і становила лише 1,7–1,4 % на їх користь.

Схожі зміни щодо переваги цих генотипів набули місце й у разі оцінки амінокислотного складу молока за сумарним вмістом замісних амінокислот. Зокрема, генотип корів ВВ, на відміну від генотипу АА, вирізнявся найбільшим у структурі білків молока рівнем глютамінової кислоти на 17,2 % ( $p < 0,01$ ) та аргініну – на 12,5 % ( $p < 0,05$ ).

З іншого боку, молоку корів цієї групи також був властивий вищий вміст серину на 12,7 %, аспарагінової кислоти – на 19,2 % та тирозину – на 3,2 %, хоча ця розбіжність виявилась досить суттєвою, результат є статистично невірідним.

Поліпшення якісного складу молока корів із генотипом АВ проти особин із генотипом АА супроводжувалось кількісним зростанням вмісту глютамінової кислоти на 3,8 %, аргініну – на 4,6 %, аспарагінової кислоти – на 5,3 % та тирозину – на 2,6 %. Тоді, як вміст у білках молока корів із генотипом АА і АВ таких амінокислот як пролін, гліцин, аланін та сумарної кількості цистину і цистеїну був більший проти представниць із генотипом ВВ відповідно на 25,4–11,3 % та 19,1– 6,1 %, на фоні різниці в 1,6 і 0,2 % за вмістом у них серину, цистину і цистеїну разом взятих, що безперечно свідчило про гіршу харчову цінність продукту. Відмітною особливістю складу молока корів із генотипом ВВ є тенденція щодо підвищення у ньому на 5,6 і 3,8 % співвідношення незамінних амінокислот до замісних порівняно з тваринами з генотипами АА і АВ.

Поступаючись тваринам із генотипом ВВ корови з генотипом АВ перевищували середні значення відповідного показника у представниць із

генотипом AA на 1,8 %. Це збільшення у тварин із генотипами АВ і ВВ сталося, перш за все, за рахунок підвищення питомої частки незамінних амінокислот на 0,6 і 2,0 % проти корів із генотипом AA.

Отже, зростання величин амінокислотного індексу в тварин із генотипами АВ і ВВ ймовірно може свідчити про те, що не зважаючи на нижчий рівень молочної продуктивності, прояв амінокислотних затрат на синтез білків молока у них є меншим.(3)

## РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 1.1. Виділення ДНК

Виділення ДНК із біологічного матеріалу – крові корів чорно-рябої молочної та голштинської порід за допомогою набору EliGene® Blood DNA Isolation Kit дотримуючись усіх інструкцій

Буфер для елюції B5.

1. Додайте 200 мкл цільної крові в пробірку для лізису на 1,5 мл (постачається) і додайте 20 мкл протеїнази К.

**Довідкова інформація:** протеїназа К руйнує клітинну стінку та сприяє лізису клітин. В інкубації немає необхідності.

2. Додайте 200 мкл буфера для лізису B1 і перемішайте, перемішуючи протягом 15 секунд.

**Довідкова інформація:** Lysis Buffer B1 – це реагент для лізису, що містить хаотропну сіль і неіонний детергент.

3. Інкубуйте зразок при 65 °C протягом 15 хвилин і коротко відкрутіть, щоб зібрати лізат з кришки.

**Довідкова інформація:** тепло сприяє денатурації білків і завершує лізис.

4. Додайте 210 мкл буфера для зв'язування B2 і коротко перемішайте на вортекс-системі протягом 15 секунд. Коротко обертайте, щоб зібрати зразок з кришки та інкубуйте зразок 2 хвилини при кімнатній температурі.

Передумови: буфер для зв'язування B2 містить пропанол і хаотропну сіль для забезпечення оптимальних умов для зв'язування ДНК.

5. Перенесіть увесь лізат (630 мкл) у центрифугуючий фільтр і центрифугуйте протягом 1 хвилини при 10 000 x g.

**Довідкова інформація:** ДНК зв'язується з кремнеземною мембраною в спіновому фільтрі, оскільки вона знаходиться в хаотропній солі. Потік рідини містить незв'язаний клітинний матеріал, такий як денатуровані білки та РНК.

6. Перемістіть обертовий фільтр у нову пробірку для збору на 2 мл (постачається).

7. Додайте 500 мкл промивного буфера В3 до центрифужного фільтра. Центрифугувати протягом 1 хвилини при 10 000 x g.

**Довідкова інформація:** промивний буфер В3 — це промивний розчин на основі солі, який очищає ДНК, пов'язану з віджимом. Фільтрувати від інших домішок.

8. Зніміть центрифужний фільтр і викиньте потік. Помістіть спіновий фільтр назад у ті ж 2 мл збірної трубки.

9. Додайте 500 мкл промивного буфера В4 до центрифужного фільтра. Центрифугувати 1 хвилину при 10 000 x g.

**Довідкова інформація:** промивний буфер В4 – це промивний розчин на основі етанолу, який очищає ДНК, пов'язану з спіновим фільтром. Видаляє всі залишки солей.

10. Зніміть центрифужний фільтр і викиньте в потік. Помістіть спіновий фільтр назад у ті самі 2 мл збірної трубки.

11. Знову центрифугуйте протягом 2 хвилин при 12 000 x g, щоб висушити мембрану центрифужного фільтра.

Передумови: Спіновий фільтр повністю висушений від залишків етанолу для максимального вивільнення ДНК із мембраного спінового фільтра на етапі елюції.

12. Обережно вийміть центрифужний фільтр і перенесіть його в нову пробірку для збору на 2 мл.

13. Додайте 100 мкл елюційного буфера В5.

Примітка: щоб збільшити збір, інкубуйте протягом 5 хвилин при 65 С.

14. Центрифугуйте 1 хвилину при 10 000 x g.

15. Зніміть блок обертового фільтра. Геномна ДНК у пробірці тепер готова до використання для будь-якого застосування.

**Довідкова інформація:** Буфер для елюції В5 – це 10 мм ТРІС, він вивільняє

ДНК із фільтра та переходить у пробірку для збору 2 мл ДНК, яка вивільняється через відсутність солі та етанолу.

## 1.2. ПЛР-ПДРФ

Для ампліфікації фрагменту гена κ-Сп використовували наступні праймери:

5' GAAATCCCTACCATCAATACC-3'.

5' CCATCTAC CTAGTTTAGATG-3'.

Довжина ампліфікованого фрагменту складає 273 п. н. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції використовували реакційну суміш об'ємом 10 мкл.

Склад реакційної суміші наступний:

4,6 мкл H<sub>2</sub>O;

2,0 мкл буфера ПЛР 5-х (15 м Mg-1,0 мол);

1,0 мкл dNTP суміші 10-х (2мМ кожного);

0,8 мкл двох праймерів (70 нг кожного);

0,1 мкл Taq-полімерази (1мол/1000 U);

1,5 мкл ДНК 50-100 нг.

Температурний режим ПЛР – ампліфікації гена капа-казеїну:

початкова денатурація – 4 хв. при 94°C, яку проводили у 34 цикла:

денатурація – 94°C - 15 сек;

випал праймерів – 58°C 15 сек;

синтез – 72°C 15 сек;

термінальна елонгація – 72°C – 5 хв.

Суть методу ПЛР - ПДРФ полягає в аналізі довжин рестрикційних фрагментів, відмінності за якими можуть бути виявлені безпосередньо за допомогою гель-електрофорезу. Для аналізу поліморфізму генів використовують рестриктази, підібрані до певних праймерів кожного гена.

Склад суміші для рестрикції: вода – 3,5мкл; буфер R (10mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM

KCl, 0,1 mg/ml BSA) – 1,5 мкл; рестриктази Hinf I, Hind III – 0,5 мкл; ПЛР суміш – 10 мкл. Для рестрикції гена κ-Cn використовували рестриктази HinfI та Hind III при  $t$  37 °C 8 – 12 год. Продукт ампліфікації гена CNS3 з вказаними праймерами включав ділянку 4-го екзона і 4-го інтрона гена. Після рестрикції цього фрагменту рестриктазою Hind III, виявляли два алельні варіанти А і В гену κ-Cn. Варіант В гену CNS3 характеризується наявністю двох точкових мутацій, в положеннях 136 і 148, що призводить до амінокислотних замін Tyr на Iso і Ala на Asp. У тварин з генотипом ВВ після рестрикції виявляли два фрагменти довжиною 182 і 91 п.н. У носіїв генотипу АА сайт рестрикції для цієї рестриктази відсутній, а присутній нерестрикційний продукт ампліфікації розміром 273 п.н. (рис. 2.2).

	ПЛР	АА	АВ	ВВ
273	—	—	—	—
182			—	—
91			—	—

Рис. 2.2. Схема розташування на гелелектрофореграмі рестрикційних фрагментів гена κ-Cn в залежності від генотипу тварин при застосуванні рестриктази Hind III.

При використанні рестриктази HinfI у тварин з генотипом АА виявляли фрагменти довжиною 113 , 91, 49 п.н.; генотип тварин АВ був представлений фрагментами 224, 113, 91, 49 п.н., а тварини з гомозиготним варіантом ВВ мали два фрагмента розміром 224 та 49 п.н. (рис. 2.3)

	ПЛР	АА	АВ	ВВ
273	—			
224			—	—
133		—	—	
91		—	—	
49		—	—	—

Рис. 2.3. Схема розташування на гелелектрофореграмі рестрикційних фрагментів гена κ-Cn в залежності від генотипу тварин при застосуванні

рестриктази HinfI.

Для визначення генетико-популяційних параметрів використовували наступні показники: частоти генотипів та алелей, значення фактичної ( $H_o$ ) та очікуваної гетерозиготності ( $H_e$ ), індекс фіксації Райта ( $F_{is}$ ), ефективна кількість алелей ( $n_e$ ).  
Всі розрахунки проведено за використання програми Popgen32Version 1.32 .

Частоти гаплотипів визначали шляхом розрахунку EM-алгоритму за використання програми EN+ .Розрахунки стандартизованої міри відхилення від рівноважного стану проводили з використанням програми 2LD .

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Аналіз проведених досліджень

Було встановлено, що за геном капа-казеїну  $\kappa$ -Сп (рис. 3.1) частота алельного варіанта А, що асоційований з підвищеним надоем, значно вища, ніж частота алеля В ( $p < 0,001$ ).

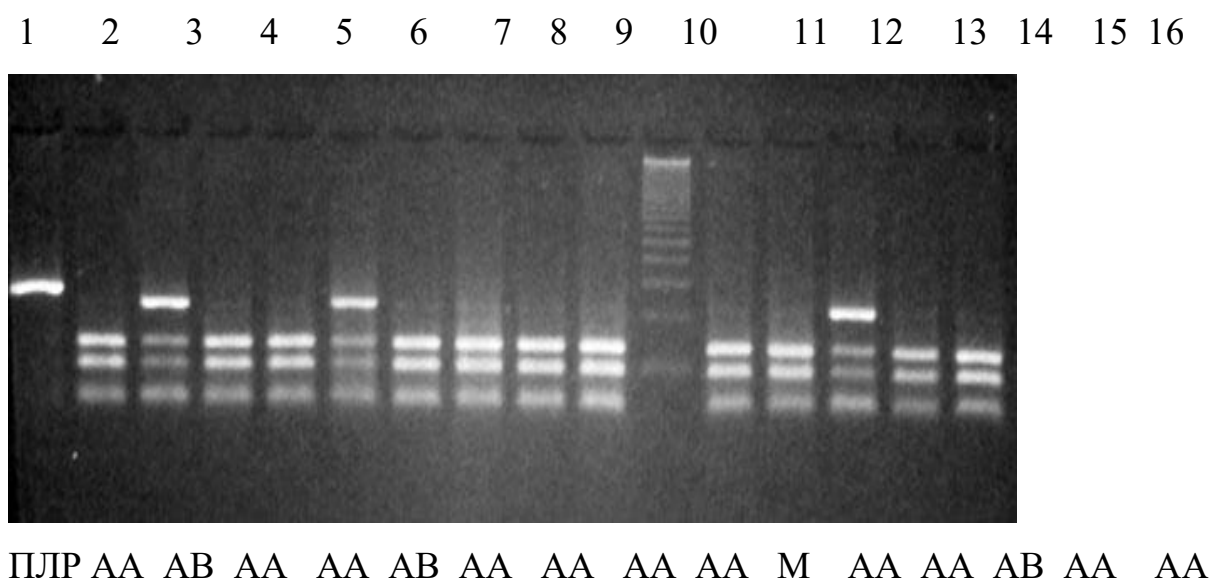


Рис. 3.1. Електрофореграма розділення продуктів рестрикції гену капа-казеїну (рестриктаза *Hinf* 1) у тварин української чорно – рябої молочної породи.

Доріжки:

1 – ПЛР продукт без рестрикції (273 п.н.);

2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16 – гомозиготні тварини з генотипом АА (133, 91, 49 п.н.);

3, 6 13 – гетерозиготні тварини з генотипом АВ (224, 133, 91, 49 п.н.);

11 – маркер молекулярних мас DNA Ladder, GeneRuler™ 50 bp.

Алельний варіант В-гена  $\kappa$ -Сп, асоційований із високим вмістом білка в молоці та кращими технологічними показниками для виробництва твердих сирів .

Але, у дослідженій популяції, частота цього алеля знаходилася на дуже низькому рівні – 0,033, тварин з генотипом ВВ взагалі не було виявлено. Частка тварини з генотипом АВ становила 6,6 % проти гомозиготних тварин з генотипом АА (93,4 %) ( $p < 0,01$ ).

Необхідно відмітити, що як за вмістом масової частки жиру, так і білка превалювали корови з генотипом ВВ проти представниць із генотипами АА і АВ, за вірогідної різниці між генотипами АА і ВВ. Особливо це помітно розпочинаючи з четвертого місяця лактації. У корів із генотипом АА і ВВ відповідні зрушення відбувалися рівномірніше: плавно посилюючись із незначними коливаннями величин аж до четвертого місяця лактації, кількісний рівень цього компонента молока незначно знижувався на п'ятому, у подальший період обліку знову таки відновлювався, спадав на сьомому, але розпочинаючи з восьмого місяця стрімко нарощувався до завершення лактації.

Збільшенням витрат грошових коштів у межах окремих статей структури собівартості виробництва молока від корів із генотипом ВВ спричинило незначне зростання величин загальної собівартості проти тварин із генотипами АА і АВ. Розрахунок економічної ефективності виробництва молока підтвердив встановлені кількісні закономірності в прояві продуктивних ознак корів із різними генотипами капа-казеїну та дав змогу оцінити витрати у вартісному виразі (табл. 3.32). Відмінність між піддослідними групами за основними споживчими властивостями молока позначилася на рівні його товарності, який знаходився в діапазоні від 93,6% (генотип АА) до 100,0 % (генотип ВВ) та гатунковості: у корів із генотипами капа-казеїну АА і АВ молоко мало вищий гатунок, а із генотипом ВВ – «екстра». У процесі визначення показників економічної ефективності встановлено, що завдяки збільшенню кількості реалізованої продукції від корів із генотипом АА, собівартість 1 ц виробництва їх молока була нижчою на 27,1 і 63,1 грн або 3,6 і 8,0 % проти тварин відповідно із генотипами АВ і ВВ. У той час як виробництво молока за використання останніх виявилось також економічно

доцільним: зростання масових часток білка та жиру в одержаній продукції компенсувало незначне збільшення витрат на її виробництво, обумовлюючи зростання ціни реалізації на 72,5 і 180,0 грн/ц або 6,2 і 15,4 % та суми виручки від продажу – на 107,8 і 238,5 тис. грн або 2,9 і 6,4 % порівняно з представницями відповідно з генотипом AA. Тобто, за однакової чисельності тварин у виробничих групах та відмінності їх лише за геном капа-казеїну, можна одержати різні як обсяги молока, так і вміст основних компонентів, які й є головними критеріями його вартісної оцінки.

За загальними показниками генетичної мінливості за локусом CSN3 популяція характеризується наступними значеннями: фактична гетерозиготність ( $H_o$ ) – 0,40; очікувана гетерозиготність ( $H_e$ ) – 0,32; індекс фіксації Райта ( $F_{is}$ ) дорівнює - 0,25; ефективна кількість алелів ( $n_e$ ) – 1,47. Слід зазначити, що у дослідній популяції виявлено значне переваження частоти зустрічальності алелю А, причому питома частка – саме за рахунок великої кількості гомозиготних особин CSN3AA . Алель В присутній у популяції тільки у складі гетерозигот CSN3AB (гомозиготних особин за алелем В не виявлено взагалі). Не дивлячись на значення індексу фіксації Райта (значення аутбридингу досягає 25 %) дослідна популяція корів знаходиться в стані генетичної рівноваги ( $\chi^2=3,13$ ;  $p>0,05$ ).

Таблиця 1

**Результати індивідуального типуювання особин великої рогатої худоби  
голштинської молочної породи за локусом капа-казеїну**

№	Генотип	№	Генотип
1	AA	16	AA
2	AB	17	AA
3	AA	18	AA
4	AB	19	AA
5	AA	20	AB
6	AA	21	AA
7	AA	22	AA
8	AA	23	AA
9	BB	24	AA
10	AB	25	AA
11	AB	26	AA
12	AB	27	AA
13	AA	28	AB
14	AA	29	AB
15	AA	30	AA

Таблиця 2

**Результати індивідуального типування особин великої рогатої худоби української черно-рябої молочної породи за локусом капа-казеїну**

№	Генотип	№	Генотип
1	AA	16	AA
2	AB	17	AA
3	AA	18	AA
4	AA	19	AB
5	AA	20	AA
6	BB	21	BB
7	AB	22	AA
8	AA	23	AA
9	AA	24	AA
10	AA	25	AA
11	AA	26	AA
12	AA	27	AA
13	AA	28	AA
14	AA	29	BB
15	AA	30	AA

За результатами бродильної проби молоко корів із генотипом AA відповідало II класу сиропридатності за задовільної оцінки якості. Казеїнові згустки мали дрібнозернисту структуру зі слабким відокремленням сироватки та незначною кількістю порожнеч, заповнених нею, проте це не знижує їх цінності у процесі виробництва якісного сиру кисломолочного. Молоко корів із генотипами AB та BB належало до I класу сиропридатності з оцінкою добре. На початку стадію зсідання молока, без видимого відшаровування сироватки, більш щільну структуру білкових згустків, без розривів та бульбочок газу на розрізі в зразках

цих тварин, встановлено після 24 годин експозиції. Молоку, відібраному від корів із генотипом АА, за сичужно-бродильною пробою присвоєно II клас сиропридатності з оцінкою якості задовільно. Казеїнові згустки була характерна солом'яно-жовтий колір сироватки, пластична на дотик консистенція із рідкісними вічками, які були розташовані вздовж усієї довжини сирної смужки (8,5 см). За органолептичними показниками у зразків не було стороннього присмаку та запаху. Зразки молока корів із генотипом АВ виявилися кращими за генотип АА і відповідали I класу сиропридатності з оцінкою добре. Згустки володіли гладкою, глянцевою, суцільною поверхнею, були пружні на дотик, без бульбочок газу на розрізі, довжина сирної смужки становила 11,0 см, їх покривала прозорого кольору сироватка, пластівців сиру на стінках або ж осад на дні лабораторного посуду не було. Молоко, отримане від корів із генотипом ВВ, також було оцінене за якістю як добре і зараховано до I класу сиропридатності, при цьому згустки характеризувалися гладкою поверхнею, більш щільною структурою, без вічок і розривів, плавали у прозорій не тягучій сироватці, довжина сирної смужки становила 12,5 см. Окрім зазначених властивостей, згустки з молока тварин із генотипами АВ і ВВ зформувалися із властивими кисломолочним продуктам запахом, смаком та кольором.

Молока яке оцінювалося за критеріями такі як дуже погане (IV клас) і погане (III клас) за бродильною пробою і погане (III клас) за сичужно-бродильною пробою не було виявлено. Разом з цим, за здатністю витримувати теплову обробку за високих в процесі технологічної переробки ефект не сильно виявлявся як за бродильною і сичужно-бродильною пробами, інакше кажучи, молоко корів усіх генотипів капа-казеїну віднесено до II групи сиропридатності. Отже, білки молока корів усіх груп виявилися стабільними і не утворювали пластівців за дії водного розчину етилового спирту з об'ємною його часткою 75 %. Концентрація вільних іонів гідрогену в молоці протягом доби після доїння значним чином не впливала на здатність білкових згустків до згортання. Зі збільшенням часу скисання при

кімнцесітній температурі молоко не набагато втрачало свої первинні властивості .

Характер домінування за чисельністю життєздатних клітин молочнокислих бактерій в сирі килломолочному, виготовленому з молока корів із генотипом АА, у порівнянні із генотипами АВ та ВВ, на цьому експерименті посилювався майже ввтричі. За настання 15-ї доби зберігання, у зразках сиру кисломолочного, виготовленого з молока корів усіх генотипів капа-казеїну, відмічено подальшу інтенсифікацію темпів збагачення чисельністю життєздатних клітин молочнокислих бактерій, які у тварин із генотипами АВ і ВВ здобули найбільших величин, чим перевершили особин із генотипом АА відповідно на 18,0 і 66,1 %. Однак в міждобовому інтервалі часу від початку до завершення зберігання, загальне число життєздатних клітин молочнокислих бактерій у сирі кисломолочному, виготовленому з молока корів із генотипом АА, зросло на 64,6%, тоді як у представниць із генотипами АВ і ВВ – у 6,3 і 7,6 рази.

Встановлено, що мікроструктура сиру кисломолочного, виробленого з молока корів із генотипом ВВ, мала найщільнішу білкову міцелу. Лише подекуди на окремих ділянках мікропрепарату чітко проглядалися ізольовані острівці з вкрапленнями казеїну видовженої або овальної форми, деякі з яких прикріплялися до вже добре сформованої загальної структури міцели. Білкові конгломерати на мікропрепараті цих тварин відокремлювалися один від одного найменш утвореними, серед решти груп, різноманітної форми та розміру рідинними порожнечами, що пояснюється синергетичними властивостями отриманого згустку, які залежать від складу та властивостей молока. Мікроскопічно на препараті сиру кисломолочного, виготовленого з молока корів із генотипом АВ, відмічали незначне порушення однорідності його структури завдяки розпушеного вигляду, наявності складних і простих розгалужень казеїнових конгломератів, у місцях з'єднання яких добре помічалися більші за розміром, ніж у тварин із генотипом ВВ, витягнуті прошарки з рідинними порожнечами. Білкові конгломерати, що оточують загальну міцелу переважно мали овальну форму.

Однак різниця від інших генотипів на мікропрепараті сиру кисломолочного, виготовленого з молока корів із генотипом АА, структурна перебудова загальної міцели виявилась найгіршою, що позначилось виразною рихлістю конгломератів, розміщених безпорядно. За рельєфною конфігурацією вони охарактеризувалися призматичною або кубічною формами. Натомість, будова основної міцели відмітилася численною кількістю різноманітних (від дрібних до великих) хаотичнорозміщених на всій площі препарату рідинних мікропорожнеч.

Натомість незначно кращими виявилися технологічні властивості продукту, одержаного від тварин із генотипами АВ і ВВ. У цілому ж молоко усіх груп виявилось придатним для виготовлення сиру кисломолочного, так як час, витрачений на коагуляцію білків під дією експериментального сичужного ферменту, не перевершував діючі вимоги нормативної документації (40 хв). За цих умов спостерігали вірогідне пришвидшення утворення казеїнових згустків у зразках продукту корів із генотипом ВВ на 1,6 хв або 10,7 % ( $p < 0,05$ ) щодо тварин із генотипом АА і скорочення тривалості часу його зсідання – на 1,2 хв або 8,2 % проти особин із генотипом АВ. Поступаючись тваринам із генотипом ВВ за швидкістю зсідання білків, утворення казеїнових згустків під дією експериментального сичужного ферменту в зразках молока корів із генотипом АВ відбувалося скоріше за представниць із генотипом АА на 0,40 хв або 2,7 %, хоча одержані дані статистично не різнилися. Тобто наявність у геномі корів алеля В капа-казеїну стимулює покращення молокозсідальної активності в напрямі утворення казеїнових згустків за рахунок нижчого вмісту в молоці соматичних клітин, вищих масових часток сухого знежиреного залишку, білка і жиру та кількісного збагачення основними життєво необхідними амінокислотами. Цю залежність підтверджує і розподіл зразків за загальною тривалістю часу сичужного зсідання молока..

### 3.2. Детальна характеристика ПЛР-ПДРФ

ПЛР-ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) (від англ PCRRFLP або PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay). При здійсненні цього виду ПЛР спочатку проводять ампліфікацію необхідного фрагмента нуклеїнової кислоти методом стандартної ПЛР, а потім рестрикційний аналіз отриманих ПЛР-продуктів.

Метод ПЛР-ПДРФ ґрунтується на виявленні різниці нуклеотидних послідовностей гомологічних ділянок ДНК. Як вже зазначалось, ця різниця полягає в довжинах фрагментів отриманих після проведення рестрикції зразків ДНК специфічними рестриктазами (рис 11). Більшість ПДРФ-маркерів є кодомінантними (рис 12) (тобто, за допомогою цього різновиду ПЛР можна виявити мутований алель в зразках ДНК отриманих від гетерозигот). Окрім цього, ПДРФ-маркери є високоспецифічними для певних локусів геномної ДНК. ПЛР-ПДРФ часто використовується для картування геному, генотипування (рис 12), при проведенні тесту на батьківство (рис 13), діагностики спадкових захворювань (рис 13) тощо.

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів методом ПЛР використовується для диференціації штамів на основі мутацій у гені, що представляє інтерес ( Rasmussen, 2012 ). Аналізи включають ампліфікацію цільової області з подальшим розщепленням ферментом рестрикції. Рестрикційні ендонуклеази, такі як Eco RI та Hind III, розрізають ампліфіковані продукти ДНК у певних послідовностях розпізнавання, зазвичай довжиною 4–8 bp. Поліморфізми послідовностей, які можуть бути присутніми в ампліфікованому продукті, можуть змінити місце розщеплення для ферментів рестрикції. Зміни в позиціях сайтів розщеплення призводять до утворення фрагментів ДНК різного розміру. Фрагменти ДНК, утворені рестрикційним аналізом, потім розділяють за розміром за допомогою гель-електрофорезу. PCR-RFLP використовувався для характеристики штамів *Staphylococcus aureus* , отриманих із сирих молочних

продуктів ( Morandi et al., 2010 ). Найпотужнішим аспектом ПЛР-ПДРФ є його простота. ПЛР-ПДРФ можна проводити без необхідності значний досвід у молекулярній біології. однак, незважаючи на легкість використання та надзвичайну простоту ПЛР-ПДРФ, він обмежений лише місцем розпізнавання RE (рис. 1), та інші послідовності ігноруються, якщо не подвійне травлення використовується з іншим RE. Таким чином, основними обмеженнями PCRRFLP є вимога щодо специфічних RE та складність визначення точної варіації в події, в якій кілька

Одночасно націлені SNP. Однак, змішування двох ферментів в одній реакційній суміші може частково вирішити цю проблему.<sup>22</sup> Тим не менш, щодо травлення, там є додаткові ускладнення через різні типи кофактори та концентрації, необхідні для кожного RE до виконати заплановане завдання стандартизованого травлення.<sup>17</sup> In Крім того, вищі витрати на ПЛР-ПДРФ внаслідок вищі витрати на подвійне або потрійне травлення додали ще один неминуче обмеження, яке не можна було виключити з експериментів скринінгу після ПЛР. Стосовно PCR-SSCP кілька попередніх звітів вказували на простоту цієї техніки.

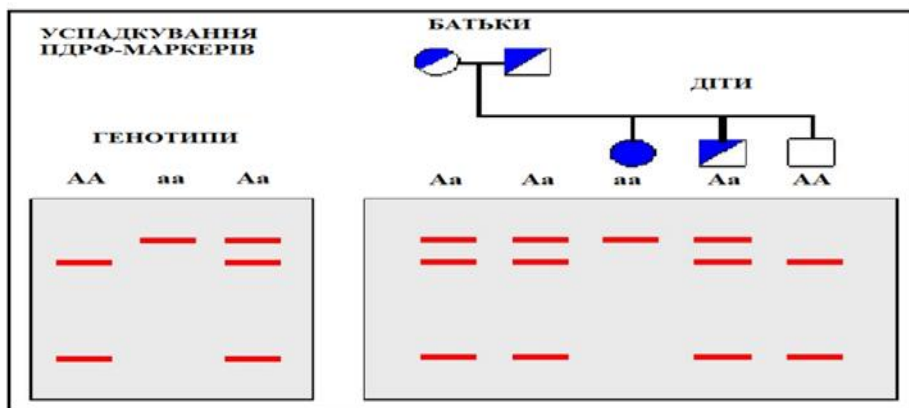


Рис. 13. Використання ПЛР-ПДРФ при проведенні тесту на батьківство та врахування ймовірності виникнення спадкових захворювань. Рисунок адаптовано з інтернет-ресурсу [www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР](http://www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР).

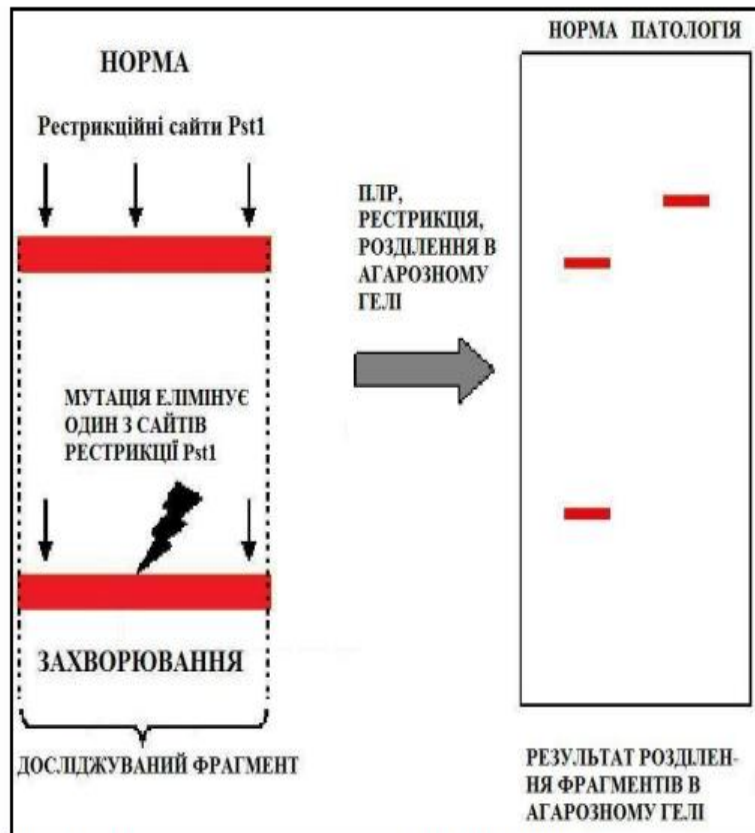


Рис. 11 . Принцип проведення методу ПЛР-ПДРФ. В якості прикладу наведено мутацію сайту рестрикції PstI. Рисунок адаптовано з інтернет-ресурсу [www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР](http://www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР).

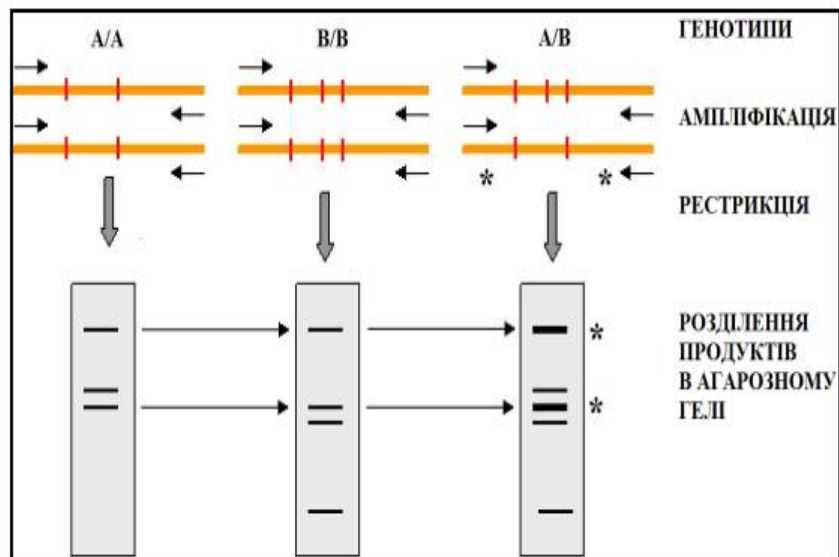


Рис. 12. Використання ПЛР-ПДРФ для генотипування. Рисунок адаптовано з інтернет-ресурсу [www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР](http://www.uk.wikipedia.org/wiki/ПЛР).

Для аналізу ПЛР-ПДРФ наявні такі етапи

1. Першим кроком у типуванні ДНК є виділення ДНК із зразка, будь то кров, слина, сперма чи інший біологічний зразок.

2. Очищена ДНК потім розрізається на фрагменти ферментами рестрикції. Для прикладу візьмемо шаблон GCGC і уявіть, що це трапляється в ДНК більше одного разу. Кількість разів, коли це відбувається, унікальна для окремої людини. Рестрикційний фермент розрізає ДНК на дві частини в кожному місці, де виникає патерн GCGC.

3. Фрагменти рестрикції мають негативний заряд і можуть бути розділені за допомогою техніки, яка називається гель-електрофорез, яка розділяє фрагменти ДНК залежно від їх розміру. Зразки ДНК, які були оброблені рестриктазами, поміщають окремими доріжками на плиту електрофоретичного гелю, через яку поміщають електричне поле. Фрагменти мігрують до позитивного електрода, менші фрагменти рухаються швидше, ніж більші фрагменти, таким чином розділяючи зразки ДНК на окремі смуги.

4. Помістіть нейлонову мембрану на пористу основу, потім пластикову маску (маска має бути трохи меншою за гель), дуже обережно натискаючи гель на маску. Закрийте прилад і запусіть насос (ви повинні побачити, чи утворився вакуум; якщо ні, знайдіть проблему).

5. Якщо мембрана, яка буде використана, використовується вперше, то необхідна нічна попередня гібридизація, інакше буде достатньо 4–5 годин. Інкубуйте в обертовій гібридизаційній печі при 65°C. Після попередньої гібридизації почніть гібридизацію, додавши проварений мічений зонд до попередньої гібридизації.

6. Інкубуйте протягом ночі. Смуги можна візуалізувати за допомогою люмінесцентних барвників.

#### Застосування ПДРФ

Аналіз варіацій ПДРФ у геномах був життєво важливим інструментом у

картографуванні геному та аналізі генетичних захворювань. Якби дослідник спробував спочатку визначити хромосомне розташування гена певного захворювання, він/вона проаналізував би ДНК членів сім'ї, ураженої цією хворобою, і шукав алелі ПДРФ, які демонструють подібну структуру успадкування, як у родині. захворювання. Як тільки ген захворювання було локалізовано, ПДРФ -аналіз інших сімей виявив би, хто піддається ризику захворювання або хто, ймовірно, є носієм мутантних генів. Аналіз ПДРФ також був основою для ранніх методів генетичного зняття відбитків пальців, корисних для ідентифікації зразків, вилучених на місці злочину, для визначення батьківства та для характеристики генетичного різноманіття чи моделей розмноження в популяціях тварин. Аналіз ПДРФ був проведений для швидкої ідентифікації трьох цільових видів ( *Siganus canaliculatus*, *S. corallinus* і *S. javus* ) з використанням ділянок мітохондріальних генів для полегшення вивчення видово-специфічних просторово-часових моделей розповсюдження личинок і зв'язку популяцій для сприяння управлінню рибальством ( Раваго-Готанко та ін., 2010 ).

PCR-RFLP, який також відомий як розщеплений ампліфікований поліморфна послідовність, була винайдена Ботштейном та ін.18 В У цій техніці ПЛР-амплікон обробляється певним RE розрізає ДНК в унікальному сайті рестрикції, відомому як

сайт розпізнавання, щоб створити кілька фрагментів ДНК різні розміри. Згодом перетравлені амплікони завантажуються на гель і прикладається електричне поле. Різного розміру смуги рухатимуться на різних відстанях по гелю.

Рекомендовані розміри ампліконів

Розмір ампліконів у PCR-RFLP не обмежує

успішне виконання його використання. Причина в тому, що PCRRFLP не залежить від фізичного стану амплікону.

Натомість наявність або відсутність послідовності розпізнавання єдиний крок, що обмежує швидкість; в іншому випадку це робить призначений RE

не звертати уваги на довжину відповідного амплікону.

ПЛР-ПДРФ зазвичай проводять на горизонтальній агарозі гелі. Однак для успішного проведення ПЛР-ПДРФ необхідна висока концентрація ампліконів необхідна<sup>38</sup> через обмеженість. Порівняно здатність агарозних гелів розділяти молекули з високочутливими поліакриламідними гелями. Варто зазначаючи, що ПЛР-ПДРФ можна проводити на вертикалі поліакриламідного гелю, а амплікони можна виявити високочутливі набори для фарбування сріблом.<sup>39</sup> Однак цей протокол зазвичай не застосовується в ПЛР-ПДРФ, оскільки майже всі процедури відбуваються в горизонтальних агарозних форматах.

## РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Результати власних досліджень з оцінки білкового складу молока корів свідчать про те, що в молоці тварин із генотипом ВВ містилося більше загального білка на 0,41 і 0,28 %, масової частки білка (Pro. Total) – на 0,37 і 0,25 %, за вірогідної переваги щодо вмісту протеїну (казеїну) – на 0,46 і 0,29 % ( $p < 0,001$ ) та сумарної кількості казеїну і глобуліну – на 0,39 і 0,27 % ( $p < 0,001$ ) проти особин із генотипами АА і АВ.

Залежність білкового спектру молока від впливу окремих чинників встановлено. За аналізу результатів дослідження рівня молочної продуктивності серед досліджуваних генотипів констатовано перевагу корів із генотипом капа-казеїну АА. Піддослідні тварини з генотипом АВ відзначалися середніми показниками, а особинам із генотипом ВВ були властиві мінімальні надої. Продукування молока у тварин носіїв генотипу АА за лактацію (305 діб) виявилось вищим на 204,5 кг або 3,3 %, ніж у корів із генотипом АВ, тоді як відмінність між ними і коровами з генотипом ВВ була помітно більшою на 422,8 кг або 7,1 % за статистично вірогідної різниці між ними  $p < 0,05$  на користь тварин із генотипом АА. Одержані матеріали узгоджуються з даними інших науковців. Поряд із цими дослідженнями, молоко з підвищеною на 0,21 % ( $p < 0,05$ ) масовою часткою жиру виробляли корови з генотипом ВВ проти тих, які були ьносіями генотипу АА, хоча статистична значущість міжгрупової різниці щодо масової частки білка виявилася суттєво вищою – на 0,42 % ( $p < 0,01$ ) на користь перших, що кореспондується з іншими джерелами літератури. Коливання рівня молочної продуктивності та якісного складу молока за рахунок збільшення масової частки білка в сухій речовині продукції, одержаній від корів із генотипом ВВ, сприяли зростанню кількості молочного білка на 11,65 кг або 5,8 % щодо тварин носіїв генотипу АА і на 12,53 кг або 6,3 % – проти корів із генотипом АВ.

За результатами проведених досліджень з'ясовано, що в дослідній популяції корів української чорно-рябої молочної породи не спостерігається порушення стану рівноваги за зчепленням ( $D' = 0,33$ ; що суттєво менше за критичного значення) між виявленими алельними варіантами локусів CSN2 та CSN3. Це свідчить про те, що розподіл частот гаплотипів є результатом особливостей розподілу частот відповідних алелів. Слід зазначити, що цей висновок стосується виключно конкретної популяції ВРХ української чорно-рябої молочної породи. В інших популяціях цієї ж породи ситуація може бути зовсім іншою, що свідчить про необхідність проведення генетико-популяційних досліджень у кожному окремому випадку.

Додатково до результатів проведених досліджень, звернемо увагу на наявність методичних недоліків у деяких наукових роботах. Мова йде про плутанину між визначенням частот гаплотипів та комплексних генотипів. Розглядаючи гаплотипи, автори використовують аналіз частотного розподілу лише за результатами визначення значень частот відповідних складових гаплотипу, що, насправді, має відношення тільки до, так званих, “незалежних” частот гаплотипу. За відсутності визначення “асоційованих” частот гаплотипів провести адекватний аналіз та охарактеризувати значення стандартизованої міри нерівноваги  $D'$  фактично неможливо, що й призводить до плутанини у термінології (поняття гаплотип та комплексний генотип).

Відносно дослідної популяції корів наявна достатньо велика кількість особин із гомозиготним генотипом А за локусом бета-казеїну, що свідчить про потенційну привабливість популяції для проведення спрямованої селекції (MAS), за умови типування плідників, у напрямку формування стада корів-продуцентів молока А2.

З цієї точки зору, відсутність нерівноваги за зчепленням можна використовувати, також, й у якості особливості популяції, що дає змогу сформуванню будьякі можливі варіанти (гаплотипи) між певними локусами в

напряму як збільшення показників молочної продуктивності тварин, так і з метою отримання різних типів молочної продукції (сири).

Поліпшення якості молока складна і багатогранна проблема. Для ефективного використання молочних білків за виробництва будь-яких молочних продуктів загальної кількості масової частки білка недостатньо. Саме тому варто враховувати і його структуру. Вміст масових часток загального білка, казеїну та сироваткових білків в молоці корів української чорно-рябої молочної породи різних генотипів за локусом капа-казеїну наведено. У процесі опрацювання результатів встановлено, що в молоці корів із генотипом ВВ містилося більше загального білка на 0,41 і 0,28 %, масової частки білка (Pro. Total) – на 0,37 і 0,25 %, за вірогідної переваги щодо вмісту протеїну (казеїну) – на 0,46 і 0,29 % ( $p \leq 0,001$ ) та сумарної кількості казеїну і глобуліну – на і 0,27 % ( $p \leq 0,001$ ) відповідно проти аналогів із генотипами АА і АВ.

Натомість молоко корів із генотипом АА мало гіршу якість проти тварин із генотипами АВ і ВВ за рахунок підвищеного вмісту нітрогену (казеїну) на 0,02 і 0,05 % ( $p \leq 0,05$ ), нітрогену (глобуліну) – 0,02 і 0,04 % ( $p \leq 0,05$ ) та небілого азоту – на 0,001 і 0,006 % ( $p \leq 0,05$ ). Не дивлячись на незначне відставання корів із генотипом АВ від тварин із генотипом ВВ за окремими білковими компонентами молока вони також перевершували корів із генотипом АА за сумарним вмістом казеїну і глобуліну на 0,12 % ( $p \leq 0,05$ ). Міжгрупові відміни за кількістю інших складових у молоці були не істотними і за статистичного опрацювання результатів виявилися невірогідними.

## ВИСНОВКИ

1. Молоко корів із різними генотипами за локусом капа-казеїну є придатним для виготовлення різних видів молочних продуктів, у тому числі й сиру кисломолочного. Водночас, найкращі технологічні властивості притаманні молоку корів із генотипами АВ і ВВ.

Встановлено, що молоко корів української чорно-рябої молочної породи із генотипом ВВ характеризується вищою білковою якістю, зумовлюючи кращу поживну цінність.

2. Відмінності між піддослідними групами корів за хімічним складом та фізико-хімічними властивостями молока свідчать про генетичну їх обумовленість. При цьому, молоко тварин із генотипом ВВ за локусом капа-казеїну характеризувалось як підвищеним вмістом основних компонентів, так і поліпшеною його якістю, ніж корів із генотипами АА і АВ.

3. Визначено, що параметри молочної продуктивності корів асоційовані з генотипом капа-казеїну і коливаються під впливом сезону року: використання корів 179 із генотипом АА позначилося зростанням на 3,3 і 7,1 % надоїв молока за 305 діб лактації проти тварин із генотипами АВ і ВВ і така залежність зберігається упродовж року, хоча навесні абсолютні величини відповідного показника у них є вищими – на 6,4 і 7,6 %, влітку – на 5,1 і 4,9 %, а восени – лише на 1,3 і 4,8 %.

4. З'ясовано, що молоко кращої якості, з підвищеними на 0,09 і 0,42 % масовими частками білка та на 0,16 і 0,21 % жиру, продукували корови з генотипами АВ і ВВ порівняно з генотипом АА, тоді як вміст цих компонентів був залежний від сезону року, досягаючи максимуму – у зимово-весняні місяці. При тому що технологічні співвідношення основних складових молока задовольняють умови виготовлення сиру кисломолочного.

5. Продуктивні ознаки корів із різними генотипами капа-казеїну детермінуються спадковістю плідників: коровам-нащадкам із генотипом АА лінії

Старбака властива вища на 5,8 і 12,3 % молочна продуктивність, ніж у тварин із генотипами АВ і ВВ, тоді як коровам із генотипом ВВ лінії Елевейшна – більший вміст масових часток білка – на 0,42 і 0,49 % і жиру – на 0,18 і 0,09 % щодо тварин із генотипами АА і АВ. 6. Обґрунтовано, що підвищення вмісту масової частки білка в молоці характеризується змінами амінокислотної збалансованості й білкової цінності продукції, отриманої від корів із генотипом ВВ, порівняно з генотипами АА і АВ, створюючи передумови щодо збільшення на 5,6 і 3,8 % співвідношення незамінних амінокислот до замінних та на 26,8 і 23,5 % – загальної суми складових амінокислотного скору на тлі поліпшення мікроструктури сиру кисломолочного.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ладика В.І. , Скляренко Ю.І. , Павленко Ю.М.

Характеристика генетичної структури плідників лебединської породи за генами бета- (CSN2) та капа-казеїну (CSN3).

2. Россоха В. І., Бойко О. А. Олійниченко Є. К.

Вивчення поліморфізму гену капа-казеїну у популяції породи шароле в Україні та його зв'язку з ознаками продуктивності.

2. Полева І. О., Корх І. В.

Технологічні властивості молока корів української чорно-рябої молочної породи із різними генотипами капа-казеїну за виготовлення сиру кисломолочного.

3. Кулібаба Р. О., Сахацький М. І., Ляшенко Ю. В. Аналіз розподілу частот гаплотипів за локусами *csn2* та *csn3* у популяції корів української чорно-рябої молочної породи.

5. Полева І. О. Інститут тваринництва наан національна академія аграрних наук України кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису удк 636.27.034:637.1.045(477) (043.3) дисертація продуктивні ознаки та технологічні властивості молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капа-казеїну.

6. Ю. В. Гузеєв Генетична структура ВРХ голштинського походження за геном CSN3Ю.

7. Гончаренко І.В. Дослідження генних модифікацій капа-казеїна молока ВРХ / І.В. Гончаренко, Ю.В. Гузеєв // Аграрний вісник Причорномор'я. Сільськогосподарські та біологічні науки. – Одеса: ТЕС, 2011. Вип. 58. – С. 145-151.

8. Полева І. Корх І. В. Білковий склад та поживна цінність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капа-казеїну (CSN3).

9. Martin, P., Bianchi, L., Cebo, C., & Miranda, G. (2013). Genetic polymorphism of milk proteins: Quantitative variability and molecular diversity. *Advanced dairy chemistry*. 387–429. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6>.
10. Volkandari, S. D., Indriawati, I., & Margawati, E. T. (2017). Genetic polymorphism of kappa-casein gene in Friesian Holstein: a basic selection of dairy cattle superiority. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 42(4). 213–219. <https://doi.org/10.14710/jitaa.42.4.213-219>.
11. Miluchová, M., Gábor, M., Candrák, J., Trakovická, A., & Candráková, K. (2018). Association of HindIII-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in Holstein cattle. *Acta Biochimica Polonica*. 65(3). 403–407.
11. Meyer F., Erhardt G., Failing K., Senft B. Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen Milchleistung, Eutergesundheit, Milchprotein und Blutproteinpolymorphismen bei Rindern. *Zuchtungs-Kunde*. 1990. Vol. 62 (1). P. 3–14.
12. Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H. M., Harwalkar V. R., Jenness R., Whitney R. M. Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*. 1984. Vol. 67(8). P. 1599–1631. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81485-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81485-x).
13. Martin P., Bianchi L., Cebo C., Miranda G. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Advanced Dairy Chemistry*. 2012. P. 463–514. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_15).
14. Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A.-M., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A., Caen J. P. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from k-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*. 1986. Vol. 158(2), P. 379–382. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09764.x>.
15. Alexander, L. J., Stewart, A. F., Mackinlay, A. G., Kapelinskaya, T. V., Tkach, T. M., & Gorodetsky, S. I. (1988). Isolation and characterization of the bovine k-casein

gene. *European Journal of Biochemistry*, 178(2), 395–401.  
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14463.x>

16. Azevedo, A. L. S., Nascimento, C. S., Steinberg, R. S., Carvalho, M. R. S., Peixoto, M. G. C. D., Teodoro, R. L., Verneque, R. S., Guimarães, S. E. F., & Machado, M. A. (2008). Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*, 7(3), 623–630. <https://doi.org/10.4238/vol7-3gmr428>.

17. Cinar, M. U., Akyuz, B., Arslan, K., & Ilgar, E. G. (2015). Genotyping of the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Anatolian water buffalo by PCRRFLP. *International Journal of Dairy Technology*, 69(2), 308–311. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12257>.

18. Margawati, E. T., Volkandari, S. D., & Indriawati, C. T. (2016). Genotyping of Kappa-Casein Gene of Buffalo in Indonesian. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology*. 37–44. <https://doi.org/10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.37-44>

19. Miluchova, M., Trakovicka, A., & Gabor, M. (2009). Analiza polimorfismului genei  $\beta$ -cazeinei prin metoda PCR-RFLP pentru alelele. AI și A2 la taurinele de rasă Pinzgau Slovacă. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 42 (2).

20. Review of the potential health impact of  $\beta$ -casomorphins and related peptides. (2009). *EFSA Journal*, 7(2), 231r. doi:10.2903/j.efsa.2009.231r.

21. Bonfatti, V., Di Martino, G., Cecchinato, A., Degano, L., & Carnier, P. (2010). Effects of  $\beta$ - $\kappa$ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes,  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3809–3817. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2779>.

22.. Семко Т. В. Склад та вимоги до індустріального молока як сировини для виробництва сирів. *Аграрна наука та харчові технології: зб. наук. пр. Вінницький нац. аграр. ун-т. Вінниця, 2015. Вип. 1 (90). С. 200–207.*

23. Братуняк Г. В., Вовк Я. С., Вудмаска В. Ю. Надій і якість молока при згодовуванні коровам білково-мінеральної добавки з кормовими бобами. Передгірне та гірське землеробство і тваринництво. Львів-Оброшино, 2003. Вип. 45. С. 112–115.

24. ДСТУ 3662-2018 Молоко-сировина коров'яче. Технічні умови. [Чинний від 2019-01-01]. Вид. офіц. Київ, 2018. 8 с. (Національний стандарт України).

25. Чагаровський О. П., Ткаченко Н. А., Лисогор Т. А. Хімія молочної сировини: навч. посіб. для студентів вищих навчальних закладів. Одеса: Сімекспрінт, 2013. 268 с.

26. Приходько М. Ф. Технологічні властивості молока корів української бурої молочної породи та сумського внутріпородного типу української чорно-рябої молочної породи. Науковий вісник Асканія-Нова. Нова Каховка, 2011. Вип. 4. С. 141–149.

27. Антонюк Т. А. Сезонні зміни санітарних та якісних показників товарного молока. Актуальні проблеми розвитку галузей тваринництва та рибництва: зб. тез доп. 71-ї наук.-практ. конф. наук.-пед. працівників, наук. співробітників та аспірантів фак-ту тваринництва та водних біоресурсів. (Київ, 19-20 квіт. 2017 р.). Київ, 2017. С. 14–16.

28. Молоко як можливість зберегти бурі породи ВРХ в Україні. URL: <https://kurkul.com/spetsproekty/735-moloko-a2-yak-mojlivist-zberegiti-buri-porodi-vrh-vukrayini> (дата звернення: 08.06.2020 р.).

28. Назаренко І. В., Куликовський Д. О. Динаміка складових частин молока у корів української червоної молочної породи. Новітні технології скотарств у ХХІ столітті: матеріали міжнар. наук.-практ. конф. (м. Миколаїв, 4-6 верес. 2008 р.). Миколаїв, 2008. С. 55–57.

29. Приходько М. Ф. Оцінка продуктивності та технологічних властивостей молока новостворених порід і типів худоби північно-східного регіону України: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: 06.02.04. Херсон. 2009. 20 с.

30. Машкін М. І., Могутова В. Ф. Сиропридатність молока в залежності від різних періодів утримання. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Сільськогосподарські науки: зб. наук. пр. Харківської держ. зоовет. акад. Харків: РВВ ХДЗВА, 2014. Вип. 28, Ч. 1. С. 212–217.

31. Левченко І. В. Сиропридатність молока корів сумського типу української чорно-рябої молочної породи. Розведення і генетика тварин: міжвідом. темат. наук. зб. / Інститут розведення і генетики тварин ім. М. В. Зубця НААН. Київ, 2005. Вип. 39. С. 124–128.

32. Ладика Л. М., Машкін М. І., Богомолів О. В., Денисенко С. А., Токолов Ю.І. Сиропридатність молока та якість сиру в залежності від генотипу корів. Харківський національний технічний університет сільського господарства ім Петра Василенка. Інженерія переробних і харчових виробництв. Харків, 2017. № 2 (1). С. 55–57.

33. Плівачук О. П., Димань Т. М., Облап Р. В., Сиропридатність молока корів української чорно-рябої молочної породи з різними генотипами капа-казеїну, беталактоглобуліну та пролактину. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: зб. наук. пр. Білоцерківський Нац. аграр. ун-т. Біла церква, 2016. № 2 (129). С. 116–121.

34. Овчаренко В. М., Ладика В. І. Сиропридатність молока та якість сиру в залежності від генотипу корів. Вісник Сумського державного аграрного університету. Тваринництво. Київ, 1999. Вип. 3. С. 70–73.

35. Erbe M., Hayes B. J., Matukumalli L. K., Goswami S., Bowman P. J., Reich C. M., Mason B. A., Goddard M. E. Improving accuracy of genomic predictions within and between dairy cattle breeds with imputed high-density single nucleotide polymorphism panels. *J. of Dairy Science*. 2012. Vol. 95. P. 4114–4129.

36. Thomasen J. R., Sorensen A. C., Lund M. S., Guldbandsen B. Adding cows to the reference population makes a small dairy population competitive. *J. of Dairy Science*. 2014. Vol. 97. P. 5822–5832.

37. Su G., Ma P., Nielsen U. S., Aamand G. P., Wiggans G., Guldbrandtsen B., Lund M. S. Sharing reference data and including cows in the reference population improve genomic predictions in Danish Jersey. *Animal*. 2015. Vol. 2. P. 1–9.
38. Taha F., Puhan Z. Milk protein polymorphism in Swiss dairy cattle. *Agric. Sci. Finl.* 1993. Vol. 2. P. 423–429.
- 39 Ng-Kwai-Hang K. F. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Can. J. Anim. Sci.* 1998. Vol. 78. № 3. P. 131–147
40. Çardak A. D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. *South African J. of Animal Science*. 2005. Vol. 35 (1). P. 41–47.
41. Oner Y., Elmaci C. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. *International J. of Dairy Technology*. 2006. Vol. 59 (3). P. 180–182.
42. Kučerová J., Matějček A., Jandurova O. M., Sørensen P., Němcová E., Štípková M., Kott T., Bouška J., Frelich J. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech J. Anim. Sci.* 2006. Vol. 51 (6). P. 241–247.
43. Comin A., Cassandro M., Chessa S., Ojala M., Dal Zotto R., De Marchi M., Carnier P., Gallo L., Pagnacco G., Bittante G. Effects of composite beta- and kappa-casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2008. Vol. 91 (10). P. 4022–4027.
44. Legarová V., Kouřimská L. The effect of k-casein genotype on the quality of milk and fresh cheese. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2010. Vol. 41 (4). P. 213–217.
45. Shahlla N. Mir., Ullah O., Sheikh R. Genetic polymorphism of milk protein variants and their association studies with milk yield in Sahiwal cattle. *African J. of Biotechnology*. 2014. Vol. 13 (4). P. 555–565.

46. Bovenhuis H., Van Arendonk J. A. M., Korver S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. *J. Dairy Sci.* 1992. Vol. 75 (9). P. 25–49.
47. Tsiaras A. M., Bargouli G. G., Banos G., Boscós C. M. Effect of KappaCasein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 2005. № 88. P. 327–334.
48. Lukač D., Jovanovac S., Nemes Z., Vidović V., Popović-Vranješ A., Raguž N., Lopičić-Vasić T. Association of polymorphism  $\kappa$ -casein gene with longevity and lifetime production of Holstein-Friesian cows in Vojvodina. *Mljekarstvo.* 2015. Vol. 65. № 4. P. 232–237.
49. Ivanković A., Ramljak J., Dokso A., Kelava N., Konjačić M., Paprika S. Genetski polimorfizam  $\beta$ -laktoglobulina i  $\kappa$ -kazeina pasmina goveda u Hrvatskoj. *Mljekarstvo.* 2011. Vol. 61. № 4. P. 301–308.
50. Duifhuis-Rivera T., Lemus-Flores C., Ayala-Valdovinos M. Á., Sánchez-Chiprés D. R., Galindo-García J., Mejía-Martínez K., González-Covarrubias E. Polymorphisms in beta and kappa-casein are not associated with milk production in two highly technified populations of Holstein cattle in Mexico. *The J. of Animal and Plant Sciences.* 2014. Vol. 24. № 5. P. 1316–1321.
51. Akyüz B., Arslan K., Bayram D., İşcan K. M. Allelic Frequency of KappaCasein, Growth Hormone and Prolactin Gene in Holstein, Brown Swiss and Simmental Cattle Breeds in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013. Vol. 19 (3). P. 439–444.
52. Khaizaran Z. A., F. Al-Razem Analysis of selected milk traits in Palestinian Holstein-Friesian cattle in relation to genetic polymorphism. *J. of Cell and Animal Biology.* 2014. Vol. 8 (5). P. 74–85.
53. Botaro B. G., Real de Lima Y. V., Cortinhas C. S., Prada e Silva L. F., Rennó F. P., Santos M. V. dos Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and

seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. R. Bras. Zootec. 2009. Vol. 38. № 12. P. 2447–2454.