



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 151051

(13) U

(51) МПК

A01J 5/013 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2021 05281**

(22) Дата подання заявки: **20.09.2021**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **02.06.2022**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **01.06.2022, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Данчук Вячеслав Володимирович (UA),
Мідик Світлана Вікторівна (UA),
Ушкалов Валерій Олександрович (UA),
Виговська Лілія Миколаївна (UA),
Корнієнко Валентина Іванівна (UA),
Якубчак Ольга Миколаївна (UA),
Данчук Олексій Володимирович (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41,
03041 (UA)**

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МОЛОКА ВІД КОРІВ З СУБКЛІНІЧНИМ МАСТИТОМ

(57) Реферат:

Спосіб ідентифікації молока від корів з субклінічним маститом, при якому виконують дослідження проб цільного молока. Проводять хроматографічні дослідження жирнокислотного складу молока та наступний його аналіз на вміст жирних кислот з довжиною ланцюга до C22:0, причому наявність молока від корів з субклінічною формою маститу у досліджуваному об'ємі молока встановлюють за зміною співвідношення величини піків окремих жирних кислот на хроматограмі, за умови відсутності оберненої кореляції між масляною C4:0 та капроною кислотами C6:0, і достовірного збільшення частки жирних з довжиною ланцюга від C4:0 до C14:0, при зменшенні загальної кількості поліненасичених жирних кислот.

UA 151051 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини і може бути використана для лабораторної діагностики субклінічної форми маститу у корів.

В основу корисної моделі поставлено задачу експериментально обґрунтувати спосіб виявлення молока від корів з субклінічною формою маститу з метою недопущення його до подальшої переробки на молочні продукти або споживання в їжу.

Генетично обумовлені параметри якості і безпеки молока-сировини є ключовими у його придатності до споживання та переробки. Їх характеристики істотно впливають як на рентабельність виробництва молочної продукції так і на кількість поголів'я тварин, задіяних для забезпечення його стабільності. Іншим ключовим положенням у регуляції жирнокислотного складу молока дійних корів є жирнокислотний склад кормів та інтенсивність синтезу (Kennelly J. J. 1996; Mangwe M. et al. 2020; Bryszak M. et al 2020; Miliku K. et al 2019). Однак, субклінічний мастит не тільки змінює хімічний склад молока, але й робить його не придатним до подальшого використання. Виникає питання, як відрізнити хвору тварину.

Є декілька підходів до принципів діагностики субклінічного маститу. Одні передбачають моніторинг кількості соматичних клітин в молоці (Lusis I. et al, 2017), визначення електропровідності та застосування спеціалізованих тестів на мастит, а інші — вимірювання температури рубця в режимі реального часу за допомогою проковтуваного біосенсора (Kim Heejin, et al 2019) або інфрачервоної термографії вим'я (Sathiyabarathi M. et al 2018). З'являються також публікації стосовно діагностики маститів за метаболітами сечі у лактуючих організмів (Ametaj B. et al 2018), хоча на нашу думку, з продуктивними тваринами цей підхід є дещо методично складніший.

Існує велика кількість досліджень стосовно зміни складу молока за умов субклінічного маститу (Li C. et al 2018; Pisanu S. et al 2020; Gokseoglu A. et al 2020).

За аналог корисної моделі обрано спосіб визначення вмісту епідермального фактору росту у молочній сироватці за допомогою набору для імуноферментного аналізу (Gokseoglu A. et al 2020).

Недоліком відомого способу є те, що діагностику субклінічної форми маститу необхідно проводити за допомогою специфічного набору для імуноферментного аналізу, розробленого виключно для великої рогатої худоби (США). Така методика є низькоінформативною і не відображає зміни поживної цінності молока у корів з субклінічною формою маститу, що в свою чергу ставить під загрозу якісь подальшої переробки, в разі випадкового попадання на молокопереробні заводи.

Задача корисної моделі, на підставі результатів хроматографічного визначення жирнокислотного складу молока дійних корів, ідентифікувати тварин з субклінічною формою маститу.

Поставлена задача вирішується шляхом проведення хроматографічних досліджень жирнокислотного складу молока та наступного його аналізу на вміст жирних кислот з довжиною ланцюга від C4:0 до C14:0. За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу отриманих даних встановлюємо істотний вплив субклінічної форми маститу на жирнокислотний склад молока корів. Відмічаємо силу впливу патології на вміст насичених жирних кислот від C4:0 до C14:0. Кореляційним аналізом встановлюються зміни взаємозв'язків вмісту окремих жирних кислот молока за розвитку субклінічної форми маститу в корів. Так, відповідно наших даних у здорових тварин у молоці відсоток масляної кислоти (C4:0) обернено пов'язаний із вмістом капронової кислоти (C6:0)- $r = -0,84$ ($p < 0,001$), тоді, як у хворих корів ці зв'язки відсутні.

Суть запропонованого методу полягає у тому, що величина хроматографічних піків окремих жирних кислот молока істотно залежить від фізіологічного стану молочної залози, тому хроматографічні дослідження молока-сировини на вміст жирних кислот не тільки виявлять наявний жирнокислотний склад молока, усунуть можливість його фальсифікації жирами не молочного походження, але і підтвердять відсутність змін хроматограми молока, характерних для корів з субклінічною формою маститу.

Складові елементи запропонованого способу оптимізують процес ідентифікації молока від корів, хворих на субклінічну форму маститу та забезпечують недопущення до споживання, або подальшої технологічної обробки неповноцінного секрету молочної залози дійних корів.

ПРИКЛАД ЗДІЙСНЕННЯ СПОСОБУ.

Експериментальна база - Українська лабораторія якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Для визначення жирнокислотного складу молока використовуємо стандартну методику. Екстракцію ліпідів з молока проводимо за методом Фолча (Folch J. et al, 1957). Наступним етапом підготовки проб є проведення гідролізу та метилювання жирних кислот ліпідів, отриманих з об'єднаних проб молока. Для цього до 100 мг отриманого жиру додавали 4 см³

метилового розчину гідроксиду натрію, приєднували зворотний холодильник до колби з вмістимим і кип'ятили до зникнення крапель жиру, помішуючи вміст колби з інтервалом 30-60 секунд. До вмістимого колби додавали 5 см³ метилового розчину трифториду бору продовжуючи кип'ятіння до 1 год. У киплячу суміш через верхню частину зворотного

5 холодильника додавали 3 см³ гексану та знімали з елементу нагрівання. До ще гарячого розчину додавали 20 см³ насиченого розчину хлориду натрію і перемішували 15 секунд. Відбирали верхній (гексановий) шар для дослідження згідно чинного ДСТУ (ДСТУ ISO 5509-2002). Аналіз метилових ефірів ЖК проводили на газовому хроматографі Trace GC Ultra (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Умови хроматографування: температура колонки 140—

10 240 °С, температура детектора 260 °С. Проба у хроматограф вводить за допомогою автосамплера TriPlus в дозі 1 мкл. Тривалість аналізу складає 65 хв.

Ідентифікація жирних кислот проводиться за допомогою стандартного зразка (Supelco 37 Component FAME Mix або аналога). Кількісну оцінку спектру жирних кислот ліпідів молока здійснюють методом внутрішньої нормалізації, визначаючи їх вміст у відсотках. Дослідження

15 проводять у 2-х паралелях згідно чинного ДСТУ (ДСТУ ISO 5508-2001).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці показників оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Відмінності між показниками, що порівнювались, вважали вірогідними за рівня значимості $P \leq 0,05$. Результати досліджень наведено у таблиці.

Встановлено, що завдання поставлене корисною моделлю виконано. Дослідження жирнокислотного складу молока, залежно від фізіологічного стану тварин та ураження вимені корів субклінічним маститом, засвідчили значну силу впливу встановленої патології на вміст C4:0, C6:0, C 10:0, C 12:0, C 14:0- $\eta^2\chi=0,61-0,94$ ум. од. ($p < 0,001$) та C 17:0, C 18:0, C18:1n9c, C18:2n6c, C20:0, C22:0 - $\eta^2\chi=0,36-0,84$ ум. од. ($p < 0,05-0,001$).

Аналіз отриманих результатів свідчить, що у молоці-сировині від клінічно здорових тварин відсоток масляної кислоти (C4:0) обернено пов'язаний з вмістом капронової кислоти (C6:0)- $r=-0,84$ ($p < 0,001$), тоді, як у хворих на субклінічний мастит тварин ці зв'язки відсутні. Натомість встановлено наявність досить високого показника впливу ($\eta^2\chi > 0,9$; $p < 0,001$) субклінічної форми маститу дійних корів на вміст C4:0 (масляної кислоти) у їхньому молоці.

Таким чином, за відсутності оберненої кореляції у молоці між масляною (C4:0) та капроновою кислотами (C6:0) за достовірного збільшення частки жирних з довжиною ланцюга від C4:0 до C 14:0 на тлі зменшення загальної кількості поліненасичених жирних кислот, таке молоко відносять, як молоко від корів з субклінічним маститом.

Таблиця

Жирнокислотний склад молока корів хворих на субклінічну форму маститу ($M \pm m$; $n=10$)

Позначення жирної кислоти	Здорові	Хворі (субклінічний мастит)	Після лікування
1	2	3	4
C4:0	3,82±0,11	5,41±0,10***	3,55±0,24
C6:0	2,64±0,14	3,45±0,11***	2,66±0,25
C8:0	1,84±0,06	1,94±0,03*	1,58±0,31
C10:0	3,31±0,07	4,31±0,10***	2,79±0,42
C12:0	3,75±0,08	4,53±0,22***	3,11±0,68
C14:0	12,71±0,16	13,74±0,19***	11,29±1,29
C14:1	1,30±0,05	1,53±0,12*	0,95±0,23
C15:0	1,41±0,20	1,18±0,07	1,61±0,29
C16:0	29,34±0,39	30,16±0,70	30,04±1,02
C16:1	1,76±0,06	2,28±0,17***	1,68±0,43
C17:0	0,73±0,06	0,55±0,05**	0,85±0,18
C18:0	10,35±0,46	7,82±0,18***	11,33±1,52
C18:1n9c	22,68±0,23	20,38±0,31***	24,75±2,71
C18:2n6c	3,87±0,20	2,22±0,29***	3,28±0,41
C20:0	0,16±0,01	0,08±0,04*	0,13±0,04
C18:3	0,25±0,01	0,39±0,05***	0,30±0,11*
C22:0	0,09±0,01	0,05±0,02***	0,09±0,02

Таблиця (продовження)

Позначення жирної кислоти	Здорові	Хворі (субклінічний мастит)	Після лікування
1	2	3	4
Насичені ЖК	70,2	73,2	69,0
Ненасичені ЖК	28,6	25,3	30,0
Мононенасичені	24,4	22,7	26,4
Поліненасичені	4,1	2,6	3,6

Примітка: вірогідні різниці, порівняно до здорових тварин $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб ідентифікації молока від корів з субклінічним маститом, при якому виконують дослідження проб цільного молока, який **відрізняється** тим, що проводять хроматографічні дослідження жирнокислотного складу молока та наступний його аналіз на вміст жирних кислот з довжиною ланцюга до C22:0, причому наявність молока від корів з субклінічною формою маститу у досліджуваному об'ємі молока встановлюють за зміною співвідношення величини піків окремих жирних кислот на хроматограмі, за умови відсутності оберненої кореляції між масляною C4:0 та капроною кислотами C6:0, і достовірного збільшення частки жирних з довжиною ланцюга від C4:0 до C 14:0, при зменшенні загальної кількості поліненасичених жирних кислот.