


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи



ХАН АЛЕКСЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА
ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК *BOS TAURUS* В МОЛОКЕ И
МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

4.3.3 – Пищевые системы

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Фоменко Олег Юрьевич

Москва, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Химический состав молока	9
1.2 Видовые различия в составе молока	11
1.3 Мировой и российский рынок продуктов из козьего и коровьего молока	14
1.4 Фальсификация молочных продуктов	17
1.5 Традиционные методы идентификации молочных продуктов	23
1.6 Молекулярно-генетические методы идентификации молочных продуктов	26
Заключение	40
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
2.1 Методология выполнения работы	41
2.2 Объекты исследований	42
2.3 Пробоподготовка лабораторных проб молока и продуктов его переработки ..	42
2.4 Экстракция ДНК из пищевых продуктов и биологических материалов	43
2.5 Измерение качественных и количественных параметров образцов ДНК	44
2.6 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозных гелях	44
2.7 Биоинформатический анализ	44
2.8 Симплексная ПЦР	46
2.9 Мультиплексная ПЦР	46
2.10 Прямая ПЦР	47
2.11 ПЦР-PB с SYBR Green	47
2.12 Мультиплексная ПЦР-PB с TaqMan-зондами	48
2.13 Статистическая обработка	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1 Сравнительный анализ эффективности методов экстракции ДНК из молока и продуктов на его основе	50
3.2 Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК <i>Bos taurus</i> , <i>Capra hircus</i> и вектора pAL2-T	59
3.3 Молекулярно-генетический анализ лабораторных молочных матриц методами ПЦР	67
3.4 Разработка молекулярно-генетического метода на основе мультиплексной ПЦР-PB	78

3.5 Разработка метода определения содержания коровьей ДНК в молочной продукции методом ПЦР-РВ	99
3.6 Молекулярно-генетический анализ промышленных молочных продуктов ...	101
ВЫВОДЫ	121
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Стандарт организации.....	148
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Акты апробации	149
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Дипломы	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Обеспечение населения безопасными и качественными пищевыми продуктами является приоритетным направлением государственной политики, согласно Стратегии научно-технологического развития от 28.02.2024 № 145 и Доктрине продовольственной безопасности Российской Федерации от 21 января 2020 г. № 20. Востребованность продукции из козьего молока среди населения обусловлена высокой питательной ценностью, противовоспалительным, противомикробным действием и т.п. Однако при производстве данного вида продуктов распространена практика подмены молока мелких жвачных коровьим молоком, что чревато нанесением непоправимого вреда здоровью уязвимым группам лиц с аллергическими реакциями на молочные белки, содержащиеся в данном сырье.

Процесс недобросовестной подмены козьего молока вызван рядом факторов: дисбаланс спроса и предложения, снижение себестоимости, сезонность данного молочного производства и др. Одним из передовых направлений идентификации видов молока является применение надежных и экспрессных молекулярно-генетических методов, обладающих высоким потенциалом для анализа многокомпонентных пищевых матриц.

Следует отметить, что данные методы обладают рядом преимуществ перед традиционными методами анализа, такими как хроматографические, иммунологические, спектрометрические и др., которые не всегда применимы в виду возможной денатурации и нестабильности целевых аналитов (белков и липидов), возникающих в процессе технологической обработки молочных продуктов.

Значимость и способы решения проблемы обеспечения продовольственной и биологической безопасности изложены в Федеральном законе № 492-ФЗ «О биологической безопасности в Российской Федерации» от 30 декабря 2020 г. и Стратегии повышения качества пищевой продукции в РФ до 2030 года (утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р).

К настоящему времени проблема идентификации фальсифицированных молочных продуктов остается актуальной в пищевой промышленности, поскольку на российском рынке отсутствуют коммерческие наборы (тест-системы), определяющие видовую принадлежность молочных продуктов. В связи с вышеизложенным, данная научно-исследовательская работа является важным шагом в изучении проблемы аутентификации продукции из козьего молока.

Степень разработанности темы исследований. Исследованиям фальсификации, идентификации и контроля качества пищевых продуктов посвящены научно-исследовательские работы отечественных и зарубежных учёных: академик РАН Галстян А. Г., Дунченко Н. И., Жижин Н. А., академик РАН Оганесянц Л. А., академик РАН Петров А. Н., Цыганова Т. Б., академик РАН Чернуха И. М., Юрова Е. А., Azad T., Deng L., Di Domenico M. и др.

Целью работы является разработка метода выявления ДНК *B. taurus* при идентификации видового происхождения молока и молочной продукции методом ПЦР-РВ.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и последовательно реализованы следующие **задачи**:

1. Рассмотреть и систематизировать теоретические аспекты вопросов видовой идентификации молока и молочных продуктов и молекулярно-генетических способов выявления фактов фальсификации в молочной промышленности;
2. Провести сравнительный анализ пригодности коммерческих наборов реагентов для экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки и возможности использования получаемых препаратов нуклеиновых кислот для последующих ПЦР-исследований;
3. Провести биоинформатический анализ видоспецифичных последовательностей ДНК, пригодных для использования в виде генных мишеней при оценке присутствия чужеродных геномов в продуктах из козьего молока;
4. Разработать молекулярно-генетический метод на основе мультиплексной ПЦР-РВ для выявления ДНК *Bos taurus* в молочных продуктах и определить его ключевые метрологические характеристики;

5. Разработать стандартизированную методику количественного определения ДНК домашнего быка в молочных продуктах;
6. Выполнить молекулярно-генетическое тестирование образцов молочной продукции из козьего молока, выработанных промышленным способом.

Научная новизна:

- получены новые знания об использовании постгеномных технологий для мониторинга и контроля качества молочного сырья, подтверждения состава и обеспечения биологической безопасности козьего молока и продуктов его переработки;
- сконструированы видоспецифические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды для проведения молекулярно-генетического анализа;
- показана возможность эффективной амплификации фрагментов ДНК домашнего быка, выделенной из молочной продукции, в диапазоне от 0,001 нг до 10 нг на реакцию.

Практическая значимость:

- расширены и экспериментально подтверждены критерии контроля качества козьего молока и продуктов на его основе с применением современных молекулярно-генетических подходов;
- разработан молекулярно-генетический метод, позволяющий идентифицировать видовое происхождение молочной продукции на основе амплификации специфических фрагментов мтДНК *Bos taurus*;
- разработан и утвержден СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

Методология и методы исследований.

В диссертационной работе применялись современные общепринятые и разработанные во ФГАНУ «ВНИМИ» молекулярно-генетические методы, применяемые в области контроля качества молочной продукции.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Набор олигонуклеотидных праймеров и гидролизуемых зондов для целевой амплификации видоспецифических локусов мтДНК *Bos taurus*.
2. Комплект реактивов для одновременной идентификации ДНК домашнего быка и внутреннего положительного контроля.
3. Методика идентификации и количественного определения генома *B. taurus* в козьем молоке-сырѐе и продуктах на его основе.

Степень достоверности и апробация работы.

Исследования проводились в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Работа была выполнена на аттестованном аналитическом оборудовании, включенном в Реестр средств измерений и прошедшем поверку.

Основные положения и результаты работы доложены и одобрены на следующих конференциях: Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики», посвященная 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова (Санкт-Петербург, 2023), XI Всероссийская (национальная) научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2023), Научно-практическая конференция «Вопросы производства сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения» (Углич, 2023), XXIII Международная конференция по науке и технологиям Россия-Корея-СНГ (Москва, 2023), 4 Международная научно-практическая конференция (Краснодар, 2024). Результаты работы отмечены дипломом III степени ФГАНУ НИИХП в рамках VI Международной научно-практической молодежной конференции (Москва, 2024), дипломом ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН в номинации «Лучший стендовый доклад» в рамках XVII Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов (Москва, 2024).

Личный вклад автора. Автором диссертационная работа выполнена самостоятельно. Непосредственный вклад автора состоит в рассмотрении

источников научной литературы, разработке дизайна теоретических и экспериментальных исследований, постановке целей и ключевых задач, проведении исследований, обсуждении полученных результатов и формулировании итоговых выводов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует пунктам 5, 17 паспорта научной специализации 4.3.3 «Пищевые системы» (технические науки), пунктам 12, 27 паспорта научной специализации 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» (технические науки).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работ, в том числе: 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 12 статей в сборниках трудов конференций и журналах РИНЦ.

Структура и объем работы. Рукопись диссертации включает в себя введение, литературный обзор, методическую часть, результаты собственных исследований и их анализ, выводы, а также список использованных источников литературы и приложений. Основной текст работы изложен на 156 страницах, содержит 24 таблицы, 68 рисунков, 222 используемых литературных источников, из которых 149 на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Химический состав молока

Молоко и молочная продукция являются продовольственными товарами социальной значимости [22]. Потребление молочных продуктов демонстрирует положительное влияние на детей с низким весом при рождении и задержкой в росте, людей, страдающих анемией и т.п. Рекомендуемая годовая норма потребления молока и молочных продуктов составляет 325 кг в год на душу населения [1].

Молоко представляет собой важный источник питательных веществ, необходимых для нормального функционирования человеческого организма. Основной объем молока (87%) составляет вода, при этом сухой молочный остаток (СОМО) (13%) включает белки, жиры, углеводы, минеральные вещества и минорные компоненты такие как витамины, ферменты, антиоксиданты и др. [61].

Основными компонентами молока, определяющими его пищевую ценность, являются молочные белки. Их общее содержание составляет около 3-4%, при этом они подразделяются на две основные группы: казеины (80%) и сывороточные белки (20%) [2, 115, 131, 141, 188]. В основном казеины представлены фракциями следующих высокомолекулярных соединений: α 1-казеин (38%), α 2-казеин (10%), β -казеин (33-39%), κ -казеин (11-13%) и γ -казеин, образующийся в результате протеолитической деградации β -казеина [28, 89, 115].

В молоке казеины образуют сложные мицеллярные комплексы с коллоидными фосфатами кальция [46]. Среди сывороточных белков преобладают β -лактоглобулин, α -лактальбумин, бычий сывороточный альбумин и иммуноглобулины [136]. В меньших количествах присутствуют второстепенные сывороточные белки: лактоферрин, белки в составе оболочек жировых шариков, лизоцим и другие белки.

Белки молока выполняют множество различных функций. Так казеины участвуют в транспорте минеральных частиц, выполняют структурную функцию, сывороточные белки обладают регуляторными, антибактериальными и другими

полезными свойствами, а также влияют на органолептические свойства молочных продуктов [46, 104, 127].

Основным углеводным компонентом молока является лактоза (98%), тогда как другие углеводы присутствуют в следовых количествах [117, 119]. Лактоза выполняет ключевую роль в энергетическом обмене, абсорбции минеральных соединений, ингибировании роста патогенной микрофлоры и т.д. Кроме того, лактоза участвует в поддержании функций сердечно-сосудистой системы, почек, головного мозга и т.д. [2, 12].

Молочный жир представлен в виде мелких сферических капель диаметром 0,2-15 мкм [185]. Его содержание варьируется в пределах 3,5-5% и выше в зависимости от сезона, рациона, породы животных и т.п. [59, 208]. Молочный жир на 98% состоит из триглицеридов, а также содержит фосфолипиды (1%), холестерол, эфиры, моно- и диацилглицеролы [70].

В составе молочного жира идентифицировано более 170 жирных кислот, включая насыщенные (~60%), ненасыщенные (~30%) и летучие жирные кислоты (~10%) [6, 13, 208]. Жировые глобулы стабилизированы липопротеидной оболочкой из органических (белки, ферменты, фосфолипиды и т.п.) и минеральных компонентов (Fe, Cu, Zn и т.п.) [10].

Макро- и микроэлементы присутствуют в молоке в растворимой и мицеллярной формах [2, 9, 118]. Ключевым микроэлементом в молоке является кальций (Ca), при этом около 69% Ca находится в коллоидной фазе в виде коллоидного фосфата кальция, 31% Ca – в растворенной форме в виде ионов Ca^{2+} или в составе различных комплексов [87, 134].

Кальций важен для роста и минерализации костей, зубов, уменьшения резорбции костной ткани, регуляции и поддержания физиологических функций (сокращение мышц, свертывание крови) и т.п. [131, 134, 159]. Кроме того, пищевая ценность молока определяется наличием в нем множества микроэлементов (Al, B, Ba, I, Se, V, Ni) и витаминов, выполняющих различные функции в организме [2]. Таким образом, молоко представляет собой сложную коллоидную систему с высокой пищевой ценностью. В составе молока находится множество компонентов

и веществ, необходимых для нормального функционирования человеческого организма и профилактики различных заболеваний.

1.2 Видовые различия в составе молока

Согласно многочисленным данным, молочные продукты, полученные от разных видов животных, характеризуются специфическим составом, хотя содержание ключевых молочных компонентов варьируется даже в пределах одного вида, поскольку определяется физиологическими, генетическими, экологическими и др. факторами (стадия лактации, интервал доения, тип питания, условия содержания и т.п.) [73, 74, 96, 185, 188]. Кроме того, существуют различия по органолептическим и физико-химическим показателям молока сельскохозяйственных животных [28, 32, 44, 89, 180, 182, 187] (таблица 1.1).

Таблица 1.1 Физико-химические показатели молока разных видов животных

Показатель	Коровье молоко	Козье молоко	Овечье молоко	Кобылье молоко	Верблюжье молоко	Буйволиное молоко
СОМО%	9,08±0,2	8,34±0,2	8,250,2	9,01±0,2	8,99±0,2	9,84±0,2
Белок (общ)%	3,28±0,1	3,95±0,1	5,91±0,1	2,20±0,1	3,86±0,1	5,62±0,1
Казеин 100 мл/г	2,7±0,6	3,9±0,2	4,9±0,2	1,7±0,3	3,8±0,3	4,2±0,2
Лактоза 100 мл/г	4,49±0,3	3,39±0,5	4,31±0,4	5,30±0,4	5,05±0,6	4,95±0,3
Жирность%	2,95±0,1	4,52±0,1	7,28±0,1	1,92±0,1	4,72±0,1	8,31±0,1
Кальций 100 мл/мг	120±0,5	154±0,2	187±0,1	81±0,3	175±0,2	182±0,4
Фосфор 100 мл/мг	84±0,4	86±0,5	142±0,3	58±0,2	97±0,3	112±0,1

Козье молоко обладает гипоаллергенными свойствами и часто рекомендуется для детского питания и пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [32, 75]. Овечье молоко отличается повышенным содержанием общего белка, фракций казеина, небелковых азотистых веществ (НБА), витамина А, минеральных веществ, а также отсутствием каротина [32, 73]. В кобыльем молоке содержится значительное количество сывороточных белков,

ненасыщенных жирных кислот, включая незаменимые (линолевая, линоленовая) [10, 11, 12].

Верблюжье молоко характеризуется специфическим запахом и светло-желтым оттенком [32]. Молоко буйволиц представляет собой белую жидкость с высоким содержанием общего белка и жира, а также пониженным уровнем каротина [32, 88].

Исследования показали, что содержание сывороточных белков в молоке различных видов жвачных животных также варьируется. В коровьем, буйволином, овечьем и кобыльем молоке отмечается высокое содержание белковых фракций β -лактоглобулина, в то время как в козьем молоке более низкий уровень β -лактоглобулина, а также высокий уровень α -лактальбумина [28, 74, 178, 192, 195, 213]. При этом в грудном и верблюжьем молоке β -лактоглобулин отсутствует [74, 178]. Согласно некоторым данным, у 82% людей с аллергией на молочные белки аллергические симптомы вызваны β -лактоглобулином, у 51% – α -лактальбумином [195].

Видоспецифические различия структуры, физико-химических свойств и состава фракций казеинов наблюдаются в молоке сельскохозяйственных животных. Так мицеллы казеина козьего молока имеют более высокую степень минерализации, меньшую термостабильность и сольватацию, а также включают больше фосфора и кальция, чем мицеллы казеина коровьего молока [47, 96, 115, 141, 180]. Крупные размеры мицелл казеинов козьего молока способствуют формированию более рыхлой структуры молочных белков, что облегчает их быстрое переваривание под действием ферментов желудочного сока [28].

Многочисленные исследования подтверждают, что среди всех фракций казеинов α s-1 казеин относится к основным пищевым аллергенам молока. Традиционно считается, что козье молоко содержит низкий уровень α s-1 казеина и повышенное количество β -казеина [21, 99, 122, 180, 195]. Важно отметить, что у домашних коров наблюдается полиморфизм гена, кодирующего β -казеин (*CSN2*). К настоящему моменту обнаружено 12 генетических вариантов гена *CSN2* среди пород *Bos taurus* (домашний бык).

Полиморфизм β -казеина влияет на технологические свойства молока и служит причиной разделения товарного коровьего молока на А1 и А2. β -казеин в молоке А1 включает аминокислоту гистидин в положении 67, в молоке А2 – пролин [163]. Согласно научным данным, в процессе переваривания β -казеина типа А1 образуются опиоидные пептиды, такие как β -казоморфины (БКМ): БКМ-5, БКМ-7 и БКМ-9. На данный момент существует мнение, что высокий уровень БКМ-7 может быть связан с риском возникновения ишемической болезни сердца, синдрома внезапной младенческой смертности, сахарного диабета I типа и неврологических расстройств (аутизм, шизофрения) [23, 27].

Однако проблема биобезопасности молока А2 остается предметом многочисленных дискуссий в научном сообществе [163]. Продукты из козьего, овечьего и других видов молока считаются более безопасны с данной точки зрения, так как в их составе отсутствует β -казеина А1 [23, 27].

Жировая эмульсия молока различных видов домашнего скота различается по размеру липидных шариков. Средний размер жировых глобул в козьем и овечьем молоке составляет 1 и 3,5 мкм соответственно [73]. Более крупные размеры жировых шариков наблюдаются в коровьем (от 0,92 до 15,75 мкм), буйволином (от 4,07 до 7,5 мкм), верблюжьем (от 2 до 3,93 мкм) и кобыльем молоке (от 3 до 6 мкм). [12, 73, 113].

Стоит отметить, что небольшие липидные глобулы жировой эмульсии козьего молока легче расщепляются липазами, что обеспечивает оптимальное усвоение данного продукта [122, 137, 177]. Кроме того, высокая доля коротко- и среднецепочечных триацилглицеридов в козьем и овечьем молоке также способствует высокой их усвояемости [150, 191].

Козье молоко является оптимальным продуктом для пациентов с нарушениями обмена веществ и различными клиническими состояниями (атопия, воспалительные заболевания и т.п.), а также для групп лиц с непереносимостью лактозы, так как в нем содержится меньше данного углевода [23, 30, 80, 122, 179, 180]. Также козье молоко обладает тонизирующим, противоанемическим и противомикробным действием [89, 96, 99, 164, 180, 188].

Сравнительный анализ молока сельскохозяйственных животных выявил значительные различия по физико-химическому составу. В частности, белковый профиль козьего молока отличается пониженным содержанием основных аллергенов. Кроме того, некоторые органические компоненты, включая липидные глобулы, мицеллы казеина, представлены в более биодоступной форме.

На российском рынке продукты из нетрадиционных видов молока позиционируются преимущественно как лечебные и гипоаллергенные. При этом их уникальный состав и свойства способствуют росту спроса среди населения.

1.3 Мировой и российский рынок продуктов из козьего и коровьего молока

Молочный рынок постоянно развивается и играет ключевую роль в экономике многих стран. Изменения в потребительском спросе оказывают существенное влияние на молочный сектор, претерпевающий в настоящее время значительные изменения в странах Евросоюза, США и других регионах [92]. Основная доля мирового производства молока (85%) приходится на крупный рогатый скот (КРС).

Тем не менее, молоко других видов животных также вносит значительный вклад в общий объем производства молочной продукции: на козье молоко приходится 12,3%, на буйволиное – 11%, на овечье – 1,7% [115]. В современной молочной индустрии наблюдается увеличение объемов производства коровьего и козьего молока, а также продуктов на их основе.

Использование смешанного молока-сырья позволяет объединить уникальные питательные свойства обоих видов молока и обеспечивает более доступную цену для потребителя. Более того, козье молоко применяется в качестве компонента при создании продуктов функциональной направленности [36, 115].

В 2022 г. мировой рынок молочных продуктов оценивался в 893 млрд. долларов, и, согласно прогнозам, к 2028 г. он достигнет 1243 млрд. долларов [57]. В том же году объем мирового производства молока составил около 887 млн. тонн, при этом доля российского молочного производства составила 4%. Последние

научные исследования прогнозируют, что с 2024 по 2028 г. мировой рынок молочных продуктов будет ежегодно расти на 7,32% [56].

В 2019 г. лидером по производству коровьего молока был Евросоюз (17%), в особенности, Германия, Франция, Великобритания, Нидерланды, Польша и Италия. За ними следовали США (19%), Индия (17%) и Китай (6%) [57, 62, 92]. Несмотря на увеличение затрат на производство и переработку молочной продукции и рост цен на молочные продукты производство товарного молока в Российской Федерации остается на высоком уровне [49, 50].

По словам бывшего министра сельского хозяйства РФ Дмитрия Патрушева, в 2023 г. было произведено 33,5 млн. тонн коровьего молока, что на 1,2 млн. тонн больше, чем в 2021 г. [24]. Тем не менее, в настоящее время темпы развития российского рынка молочных продуктов снижаются. Основной причиной данной тенденции является сокращение поголовья КРС [186]. Согласно официальным данным Росстата [50, 54], общее поголовье коров в 2024 г. сократилось на 62,5%, по сравнению с 1990 г и составило 7,5 млн. голов (рисунок 1.1).



Рисунок 1.1 – Динамика поголовья коров в РФ за период 1990-2024 гг.

Мировой рынок продуктов из козьего молока оценивался в 13 млрд. долларов в 2023 году и по прогнозам экспертов он достигнет 20,75 млрд. долларов к 2029 г., показывая ежегодный рост 8,09% [48]. В России годовой объем производства козьего молока остаётся стабильным и составляет 236-255 тыс. тонн [50]. В

особенности, развивается рынок сухого козьего молока, сухих молочных смесей и сыров из козьего молока [50, 115, 164, 188].

В период с 2007 по 2017 г. ежегодный прирост численности мирового поголовья молочных коз фиксировался на уровне 22% и достиг 218 млн. голов. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО) в 2017 г. мировым лидером по общей численности домашних коз стал Азиатско-Тихоокеанский регион (52%), за ним следовали регионы Африки, Европы и США [58, 165].

В европейских странах производство козьего молока наиболее развито в Испании, Греции и Франции [50]. В то время как в мире наблюдается устойчивый рост поголовья коз, в России с 2007 года фиксируется постепенное сокращение их численности. По данным на 2023 год [54], поголовье коз в РФ достигло 1,6 млн голов (рисунок 1.2).



Рисунок 1.2 – Динамика поголовья коз в РФ за период 1990-2023 гг.

Важно отметить, что значительная доля производства козьего молока во многих странах остается официально незарегистрированной, поскольку данный продукт часто потребляется на местном уровне или реализуется фермерами напрямую местному населению, особенно в развивающихся странах [164, 185].

Таким образом, несмотря на сокращение поголовья крупного и мелкого рогатого скота российский рынок молочной продукции продолжает демонстрировать стабильно высокие объемы производства товарного молока. В то

же время сегмент продукции из козьего молока характеризуется ограниченными объемами производства, но обладает значительным потенциалом для дальнейшего роста и развития.

1.4 Фальсификация молочных продуктов

В Российской Федерации обеспечение населения безопасными и качественными пищевыми продуктами является приоритетным направлением сохранения здоровья нации. На правительственном и международном уровне проводятся меры по надзору и мониторингу продовольственных продуктов с целью определения исходного состава сырья и проверки наличия различных добавок [3, 5, 35, 71]. К настоящему моменту фальсификация молочных продуктов широко распространена в мире [85].

В соответствии с управлением по санитарному надзору качества пищевых продуктов и лекарственных средств США FDA (Food and Drug Administration) данная проблема вызывает особые опасения во всем мире. В литературных источниках применяется термин «экономически мотивированная фальсификация» – намеренное внесение веществ обманным путем в продукт с целью снижения его себестоимости и т.п. [114, 135, 148, 196, 199]. Практика разбавления молока с последующим восстановлением его консистенции путем добавления муки, карбонатов кальция или сахаров была описана еще в древней Германской империи.

Подобные инциденты имеют исторический контекст, в частности в 1850 году была зафиксирована смерть 8 тыс. младенцев в США, потреблявших молоко Swill [132]. В прессе упоминалось, что молоко получали от больных животных, питавшихся отходами заводов [170]. До начала XIX века неправильные методы доения, хранения или получения фальсифицированного молока от больных животных приводили к возникновению опасных инфекций (туберкулез, холера, брюшной тиф и др.), представляющих серьезную угрозу для жизни.

В конце XIX века ученые выявили роль микроорганизмов в передаче инфекционных заболеваний, что привело к усилению контроля качества молока [132]. Последний наиболее известный случай фальсификации молока был связан с

добавлением токсичного меламина в молочные продукты детского питания в Китае в 2008 году, что послужило причиной смерти и серьезных проблем со здоровьем у более 200 тыс. человек [151, 184]. Продовольственное мошенничество представляет реальную угрозу общественному здравоохранению, в особенности, в развивающихся и слаборазвитых странах из-за отсутствия должного контроля на государственном уровне [78, 85, 98, 168].

На данный момент в России наблюдается увеличение количества фальсифицированных продуктов. Следует отметить, что молочные продукты на российском рынке непрерывно подвергаются проверке соответствующими организациями [8]. Согласно нормам, принятым в Техническом регламенте ТР ТС 033/2013 "О безопасности молока и молочной продукции", важно соблюдать единые принципы и правила, регулирующие качество молока, включая производство, хранение, транспортировку, продажу, а также требования к маркировке и упаковке молочной продукции [51].

В соответствии с официальными данными, доля фальсифицированной молочной продукции на прилавках магазинов составляет около 26-30% в год [8]. Тем не менее, согласно данным Россельхознадзора, данная доля может достигать 45-50% [8]. В соответствии с докладом Роспотребнадзора за первый квартал 2022 года, при исследовании 60 тысяч образцов молочных изделий в 4,57% случаев были обнаружены нарушения физико-химических параметров, а в 2,57% проб было выявлено присутствие нежелательных микроорганизмов. Как следствие, было конфисковано более 22,7 тонн низкокачественной молочной продукции [52].

Фальсификация пищевых продуктов, их подделка и неправильная маркировка могут быть вызваны различными причинами (дефицит спроса и предложения, скоропортящийся характер молока, низкая покупательская способность клиентов, финансовая выгода, недостаток доступных продуктов, отсутствие обученного персонала, применение устаревших технологий для обработки пищевых продуктов, отсутствие подходящих тестов для обнаружения незадекларированных веществ и добавок и т.д.). К настоящему моменту существуют различные виды фальсификации пищевых продуктов (рисунок 1.3).

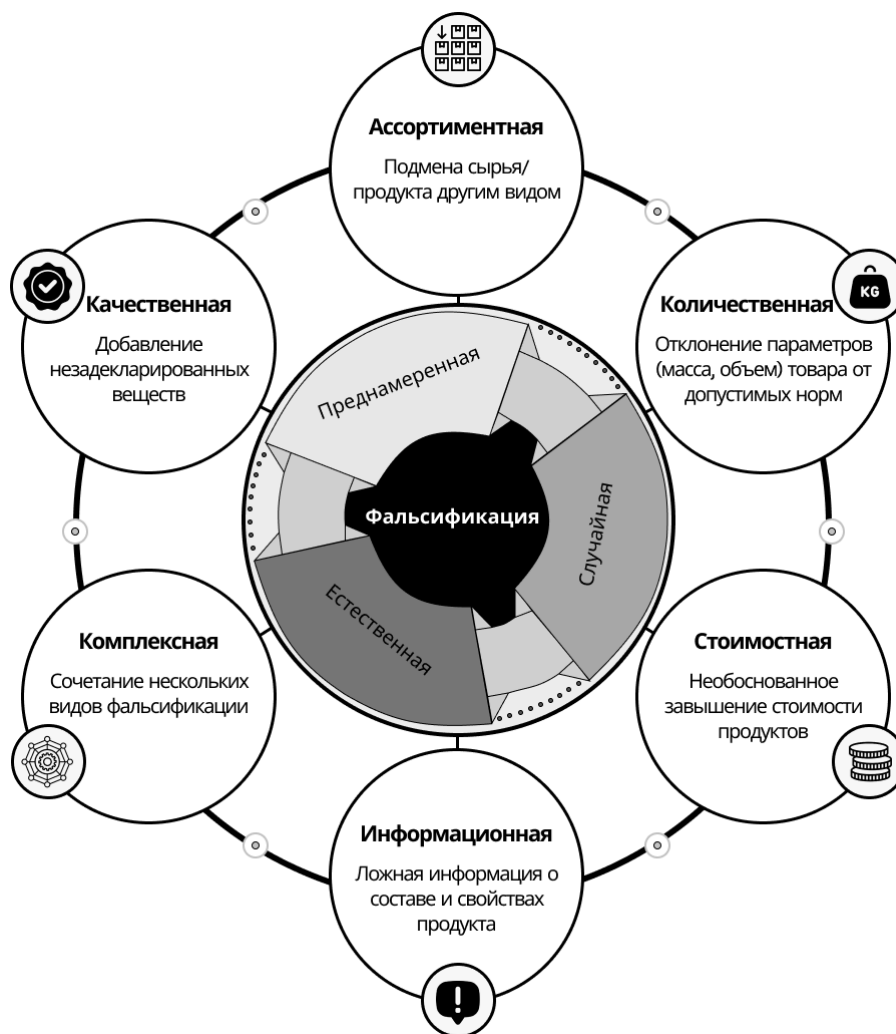


Рисунок 1.3 – Виды фальсификации

При этом отдельные виды фальсификации могут оставаться недостаточно изученными, что приводит к пробелам в общей картине и потенциально ставит под угрозу безопасность и качество молочных продуктов [95]. Исходя из суммарного анализа опубликованной литературы можно дифференцировать фальсификацию на преднамеренную (неслучайную) и непреднамеренную (случайную) [84, 98, 142, 198]. При преднамеренной фальсификации продукты питания заведомо фальсифицируются в целях улучшения внешнего вида, усиления вкусовых качеств и т.п. [116, 167].

Преднамеренная фальсификация считается самой опасной из-за замены основных компонентов продукта посторонними веществами [84]. С отсутствием надлежащих гигиенических условий производства, хранения и транспорта пищевых продуктов связана случайная фальсификация [202]. В данном контексте

непреднамеренная контаминация может включать пестициды, удобрения, загрязнения тяжелыми металлами (ртуть, мышьяк, свинец), растительные остатки, выделения животных, личинки насекомых и др.

Также рассматривают естественную фальсификацию, периодически возникающую из-за наличия в природе вредных химических веществ (токсичные разновидности бобовых, грибов, овощей и др.) [86]. Фальсификация молока может включать изменение состава сырья и качества продукта [26]. Стоимостная фальсификация подразумевает продажу товаров более низкого качества по цене продуктов высшего класса.

Намеренное распространение ложных, неполных или противоречивых сведений о составе и свойствах товара происходит при информационной фальсификации. Комплексная фальсификация обычно включает несколько видов обмана, что приводит к множеству различных нарушений [43]. Более того, отдельно выделяют и другие формы классификации пищевых продуктов (удаление целевых соединений, смешивание компонентов, использование запрещенных веществ и др.) [86, 72, 143].

В молочной индустрии фальсификатом считается молочный продукт, который заявлен на упаковке, как натуральный продукт, но на самом деле содержит незадекларированные добавки [8, 85, 168, 172]. Для получения высоких показателей содержания общего белка в молоко добавляют мочевины, меламина. [167]. Однако потребление мочевины может негативно влиять на память, повышать нагрузку на почки, а также способствовать развитию заболеваний крови и ускорению полового развития [45, 85, 112].

Потребление молока с меламинами может вызвать серьезные осложнения, включая почечную недостаточность и смерть у младенцев [85]. С целью увеличения сроков хранения в молоко вносят такие вещества, как формальдегид, перекись водорода, гипохлорит. Добавление поверхностно-активных веществ, сахарозы, хлорида натрия позволяет улучшить его физико-химические, органолептические свойства и т.п. [83].

Тем не менее потребление перекиси водорода приводит к развитию гастрита и воспаления кишечника [112]. За счет мальтодекстринов, придающих особые функциональные свойства молоку, происходит повышение плотности молока и оптимизация выхода конечного продукта. Чтобы увеличить вязкость и содержание сухих веществ в молоко подмешивают крахмал, сахар и муку [133, 172].

Впрочем, избыточное добавление крахмала может спровоцировать возникновение диареи и привести к его накоплению в организме, что опасно для пациентов, страдающих диабетом [85, 112]. Сухие молочные сыворотки широко применяются для изменения состава сырья и удешевления производимой продукции в связи с их низкой себестоимостью. Однако содержащиеся в них сывороточные белки крайне неустойчивы к тепловой обработке, что подтверждается коагуляционными процессами при пастеризации молока [26].

Экзогенное добавление воды к цельному молоку приводит не только к увеличению его объема, но и к изменению химического состава, пищевой, гигиенической и технологической ценности продукта [172, 208]. Для раскисления молока-сырья при производстве плавленых сыров и стерилизованных продуктов применяются различные соли [26]. Однако несмотря на способность солей нейтрализовать молочную кислоту, они не способны препятствовать росту и развитию микроорганизмов и могут оказывать влияние на процессы гормональной регуляции в организме [85].

При этом выявление добавления хлоридов затруднительно в связи с их наличием в молоке в достаточных количествах, а также возможным превышением нормативных показателей у животных с маститом [133]. Также распространенными заменителями молочного белка в пищевых продуктах выступают соевые белки и другие белки растительного происхождения (рис, миндаль, конопля, кокос и др.) [29]. Однако необходимо учитывать, что согласно научным данным, растительные белки, применяемые на молочных заводах, могут вызывать аллергические реакции среди потребителей [85].

Кроме того, распространенным методом фальсификации молока-сырья является замена молочного жира растительными маслами или добавление

восстановленного молока [86]. Согласно результатам исследований, Abedini et al (2023) наиболее часто фальсификация сыров происходит путем замены ключевых компонентов или снижения массовой доли жира в конечном продукте [79].

На сегодняшний день широкое распространение получила подмена более дорогостоящего козьего и овечьего молока менее ценным и более доступным коровьим молоком. Основными причинами подобного вида фальсификации являются низкое производство молока, полученного от мелкого рогатого скота, рост потребительского спроса и другие экономические аспекты, которые приводят к существенной разнице в стоимости между указанными видами молочной продукции. Более того, в развивающихся странах дефицит продовольственных товаров и низкий уровень дохода на душу населения также служат непосредственными причинами видовой фальсификации [93, 177, 187, 192, 214].

Однако важно отметить, что видовая подмена молока несет угрозу здоровью потребителей в связи с потенциальным риском возникновения аллергии. Так к клиническим проявлениям аллергических реакций к белкам коровьего молока относятся атопический дерматит, отек гортани, ринит, энтеропатия, колит, анафилаксия и др. В настоящее время пищевая аллергия на белки коровьего молока представляет собой одну из наиболее актуальных проблем в сфере общественного здравоохранения [7, 197].

Напротив, сведения о частоте встречаемости аллергических реакций на козье молоко в литературных источниках остаются ограниченными. Тем не менее, стоит учитывать иммунологические реакции отдельных групп населения на белки козьего молока [38]. В связи с этим, целесообразно проводить мониторинг состава продукции в молочной отрасли. Бесконтрольное распространение фальсифицированных продуктов создаёт угрозу национальной безопасности. В связи с этим, необходимо предпринимать меры для снижения уровня фальсификации в молочной отрасли.

1.5 Традиционные методы идентификации молочных продуктов

Согласно некоторым оценкам, экономические потери, связанные с фальсификацией пищевых продуктов, ежегодно составляют более 40 миллиардов долларов в пищевой промышленности [91]. Аутентификация продуктов, основанная на анализе происхождения ингредиентов и технологии производства, представляет собой необходимую меру контроля качества продуктов.

Использование быстрых, эффективных и надежных аналитических методов позволяет бороться с фальсификацией пищевых продуктов, контролировать их подлинность и химический состав, что важно для обеспечения безопасности продуктов животного происхождения [37, 78, 80, 106, 167, 192, 219]. Основные преимущества и недостатки существующих методов обнаружения фальсификации молока приведены в таблице 1.2 [60, 67].

Таблица 1.2 – Методы детекции фальсификатов молочных продуктов

Метод	Преимущества	Недостатки
Электрофоретические методы	Простота и высокая скорость проведения анализов	Низкая воспроизводимость, трудоемкость
Иммунологические методы	Возможность проведения качественного и количественного анализов	Длительные процедуры инкубации и промывки, необходимость специфических антител
Хроматографические методы	Специфичность	Сложности анализа термически обработанных продуктов, обширная пробоподготовка и использование только в лабораторных условиях
Спектроскопические методы	Высокая скорость проведения методов, минимальная пробоподготовка и небольшой объем пробы для анализа	Высокая стоимость оборудования и сложная интерпретация данных
Биосенсоры	Высокая скорость детекции	Высокая стоимость оборудования
ПЦР и другие молекулярно-генетические методы	Высокая чувствительность и специфичность в	Риск ингибирования реакции

Хроматографические методы анализа основаны на разделении компонентов продукта и их идентификации. Методы на основе хроматографии (ГХ, ЖХ, ГХ-

МС, ВЭЖХ и т.п.) анализируют жирные кислоты и стеролы для определения происхождения и выявления фальсификации молочных продуктов [78].

В статье Scano с учеными из Италии анализировали профили метаболитов бинарных смесей коровьего и козьего молока комбинированным подходом газовой хроматографии и масс-спектрометрии для выявления фальсификации козьего молока [191]. Однако в основе методов ГХ (газовая хроматография) и ЖХ (жидкостная хроматография) лежит экстрагирование целевых соединений, что одновременно увеличивает продолжительность анализа и ограничивает производительность [78].

Иммунохимические методы являются востребованными инструментами для выявления различных компонентов в молочных продуктах. Иммуноферментный анализ (ИФА) является высокочувствительным и специфичным методом, основанным на реакции «антиген-антитело» [158]. Выявление фальсифицированных молочных продуктов возможно методом непрямого ИФА на основе моноклональных антител против коровьего β -казеина.

Помимо классических вариантов ИФА различные модификации иммунологических методов (сэндвич-ИФА, непрямой конкурентный ИФА и т.п.) применяются для обнаружения незадекларированного добавления коровьего молока в продукты на основе молока овец, коз и буйволов [194]. Иммунологические анализы с латеральным потоком (LFIA) также представляют собой эффективные методы для проверки подлинности молока [153, 158].

К ограничениям анализов ИФА и LFA можно отнести переменную аффинность, масштабные процедуры очистки и значительное количество антител для детекции [108]. Перечисленные методы анализа демонстрируют значительный потенциал для выявления рецептурных нарушений молочных продуктов, что связано с высокой гетерогенностью белков молока и наличием множества их изоформ.

Спектроскопические методы применяются для обнаружения различных примесей в молоке. Например, Sen S. et al. (2021) определяли смеси козьего,

коровьего и буйволиного молока методом FTIR (Фурье-ИК-спектроскопия) с уровнем обнаружения 5% [193].

Дифференциацию козьего и коровьего молока также проводят определением β -каротина методами Рамановской и инфракрасной спектроскопии (MIR) [214]. В 2020 году Piras С. с коллегами выявляли низкие уровни козьего молока в овечьем молоке профилированием биомолекулярных молочных компонентов методом масс-спектрометрии (AP-MALDI) [175].

Кроме того, для обнаружения фальсификации молока используются электрофоретические методы: электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) и т.д. [158]. Метод ПААГ применяется для исследований генетических вариантов молочных белков, при этом их разделение происходит в зависимости от их электрического заряда и размера [93]. Однако данный метод обладает ограничениями, связанными со сложной интерпретацией данных и возможной денатурацией белков при тепловой обработке, высокой температуре и изменении pH [158].

Метод ИЭФ основан на разделении белков с учетом их изоэлектрических точек и позволяет анализировать генетические варианты казеинов [93]. Ранее ИЭФ считался эталонным методом выявления добавления коровьего молока в молочной продукции в странах Евросоюза, благодаря определению γ -казеинов коровьего молока после плазминолиза β -казеина [158]. К примеру, в недавнем исследовании метод ИЭФ γ -казеинов использовался для определения примесей коровьего молока в брынзе, приготовленной из овечьего и коровьего молока [220].

К недостаткам данного метода можно отнести длительность проведения методики, низкую производительность, отсутствие количественного определения и возможности дифференцирования молочных компонентов других видов домашнего скота [107, 158, 175, 220]. По сравнению с классическими методами на основе гель-электрофореза методы капиллярного электрофореза (КЭ) обладают высокой разрешающей способностью, низкой стоимостью и высокой производительностью.

Ряд научных работ, посвящен оценке происхождения молочных продуктов путем анализа белковых маркеров методами КЭ. В отличие от ИЭФ, капиллярное изoeлектрическое фокусирование (КИЭФ) представляет собой более быстрый и удобный способ разделения и идентификации пептидов, образующихся в результате гидролиза β -казеинов [158, 160].

На основе биологических взаимодействий между рецептором и молекулой-мишенью (белки, ДНК) разработаны различные биосенсоры. Биосенсоры являются простыми, высокопроизводительными и недорогими инструментами для аутентификации продуктов животного происхождения, анализа аллергенов и т.д. [158]. Например, в статье Sakti S. P показана разработка с использованием поликлонального антитела специфичного к белку коровьего молока PSS и иммуносенсора для детекции содержания коровьего молока в целевом растворе [187].

Иммунологические, электрофоретические и хроматографические методы играют значительную роль в обеспечении качества, безопасности пищевой продукции и выявлении нарушения технологических процессов. Тем не менее, к ограничениям вышеописанных методов можно отнести низкую чувствительность при анализе термически обработанных продуктов, что связано с нестабильностью анализируемых веществ (липиды, белки) при высоких температурах, давлениях и химической, технологической обработке [76, 81, 125, 152].

Кроме того, под воздействием высоких значений температуры и давления изменяются антигенные свойства и электрофоретическая подвижность белков [212]. Также следует учитывать, что электрофоретические и иммунологические методы не всегда способны дифференцировать молоко близкородственных видов домашнего скота (козы, овцы и т.п.) [120].

1.6 Молекулярно-генетические методы идентификации молочных продуктов

Непрерывный рост населения и проблема обеспечения населения достаточным количеством продовольственной продукции способствуют учащению случаев фальсификации в пищевой промышленности [102]. За

последние 10 лет опубликовано множество исследований, посвященных определению подлинности продуктов питания. Тем не менее, к настоящему моменту существует потребность в разработке новых и надежных аналитических методов, способных определять видовую аутентификацию пищевых продуктов [103].

Современные молекулярно-генетические методы применяются для выявления фальсификации, благодаря их простоте, высокой чувствительности и специфичности [77, 158, 176]. Наиболее распространенным молекулярным методом является полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР – это фундаментальный метод амплификации нуклеиновых кислот, широко используемый в лабораторной диагностике *in vitro*.

Метод основан на циклическом изменении температуры с повторяющимися циклами синтеза ДНК. При этом цепи матричной ДНК амплифицируются в результате множества циклов, включающих несколько этапов: тепловая денатурация (разделение двухцепочечной матрицы ДНК на отдельные цепи), отжиг (присоединение праймеров к одноцепочечной матрице) и элонгация (синтез олигонуклеотидов ферментом ДНК-полимеразой) [111].

Методы на основе амплификации ДНК принципиально зависят от термодинамических свойств нуклеиновых кислот, в особенности температуры плавления олигонуклеотидов (T_m) [200]. T_m дуплекса ДНК определяется, как температура, при которой половина нуклеотидов остаются комплементарно соединенными. T_m преимущественно определяется содержанием азотистых оснований в ДНК [207].

Для приблизительного прогнозирования T_m существуют формулы, учитывающих состав А+Т и G+C [200]. Эмпирическое правило Wallace–Ikatura [200, 207] часто используется для оценки температуры плавления праймеров (Формула 1.1):

$$T_d (^{\circ}\text{C}) = 2(A + T) + 4(G + C), \quad (1.1)$$

где каждый буквенный символ представляет собой число азотистых оснований в олигонуклеотиде, где А – аденин, Т – тимин, G – гуанин, С – цитозин. Хотя

изначально данная формула использовалась для оценки температуры денатурации зондов.

Wu et al. предложили уравнение, описывающее расчет эффективной температуры праймеров (T_p) (Формула 1.2):

$$T_p (^{\circ}\text{C}) = 22 + 1.46L_n, \quad (1.2)$$

где $L_n = 2(G+C) + (A+T)$.

Следует принимать во внимание, что существуют и другие формулы для расчета температуры плавления олигонуклеотидов. Однако на данный момент разработано множество программ, позволяющих быстро рассчитывать их оптимальные температуры плавления. Также необходимо учитывать и другие параметры для проведения ПЦР (концентрация ионов в буфере и т.п.) [207].

Метод получения ДНК является важным этапом для эффективного применения молекулярно-генетических методов [152]. В процессе производства молочных продуктов исходное сырьё проходит через множественные этапы термической, ферментативной, химической, механической и другие виды обработок, оказывающие отрицательный эффект на выход и качество ДНК и на её пригодность для последующей амплификации [166]. Многие компоненты в образцах биологического материала (ЭДТА, фосфаты и др.) могут стать причиной ингибирования ПЦР [162].

Кроме того, в пищевых матрицах наличие гидролитических ферментов может влиять на целостность ДНК [158]. В связи с этим, важно контролировать этапы очистки исследуемых проб с целью последующего эффективного проведения реакции амплификации ДНК [162]. Оценка чистоты ДНК определяется спектрофотометрически путем вычислений оптической плотности коэффициентов $A_{260/280}$ (соотношение поглощения при длине волны 260 нм к поглощению при длине волны 280 нм) и $A_{260/230}$ (соотношение поглощения при длине волны 260 нм к поглощению при длине волны 230 нм).

Диапазон допустимых пороговых значений показателя $A_{260/280}$ (1,8-2,0) свидетельствует об отсутствии контаминации образцов белками, фенолом и другими соединениями, у которых спектр поглощения происходит при 280 нм.

Отсутствие полисахаридов, липидов, ЭДТА и других органических компонентов со спектром поглощения при 230 нм определяют в диапазоне значений (2,0-2,2) показателя $A_{260/230}$. Стоит отметить, что значения коэффициентов $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ меньше эталонных показателей свидетельствуют о загрязнении образцов [25, 156].

На качественные и количественные показатели экстрагируемой ДНК влияют различные факторы: содержание соматических клеток (ССК), состав молока, протоколы выделения нуклеиновых кислот и др. [149]. Главным источником ДНК служат ССК (лейкоциты, клетки молочной железы и т.п.), присутствующие в молочных продуктах [105, 121]. На уровень ССК в молоке влияет ряд факторов: вид животных, стадия лактации, индивидуальные характеристики, условия окружающей среды и т.д.

Из-за высокой вариабельности количества ДНК, выделенной из соматических клеток, в образцах молока и его производных, требуются высокочувствительные методы выделения ДНК и молекулярно-генетические методы [34, 90, 121]. На данный момент существует потребность в разработке эффективных протоколов выделения ДНК из пищевых продуктов с минимальным остаточным содержанием ингибирующих соединений [4, 33, 149].

В настоящее время существует множество термоциклических, изотермических и других методов амплификации нуклеиновых кислот [111]. В контексте видовой дифференциации ПЦР-методы получили широкое распространение, благодаря их высокой специфичности, чувствительности, а также стабильности молекул ДНК [121]. ДНК-технологии не только успешно используются для проверки подлинности пищевых продуктов, но и позволяют обнаруживать неправильную маркировку и фальсификацию пищевых продуктов даже в следовых количествах в обработанных пищевых продуктах [91].

Различные виды ПЦР основаны на проведении гель-электрофореза и/или гибридизационно-флуоресцентной детекции выявления продуктов амплификации. Перечень методов ПЦР, использующихся для видовой идентификации молочных продуктов приведены в таблице 1.3 [65, 147, 149, 158, 206].

Таблица 1.3 – Молекулярно-генетические методы анализа видовой принадлежности молока

Название метода	Сущность метода	Преимущества	Недостатки
ПЦР (полимеразная цепная реакция)	Анализ за счёт амплификации фрагментов ДНК с помощью термоциклирования, создающей миллионы копий последовательности-мишени	- Быстрая и эффективная амплификация ДНК - Универсальность и широкое применение - Возможность амплификации представляющих интерес специфических областей	- Восприимчивость к контаминации - Ограниченные возможности количественного определения без дополнительных шагов
Мультиплексная ПЦР	Амплификация нескольких целевых фрагментов ДНК в одной реакции	- Одновременная амплификация нескольких мишеней - Экономия времени и ресурсов	- Повышенная сложность дизайна праймеров - Потенциальное взаимодействие праймеров
ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)	Измерение количества ДНК во время амплификации в режиме реального времени	- Позволяет получить количественные данные - Высокая техническая чувствительность, точность и специфичность - Исключение перекрестной контаминации	- Влияние ингибиторов в образцах - Требуется стандартная кривая для абсолютного количественного определения - Вариация повышается с увеличением номера порогового цикла - Перекрывание спектров излучения
Капельная цифровая ПЦР (ddPCR)	Разделение ПЦР-реакции на тысячи капель позволяет проводить абсолютное количественное определение	- Точное и абсолютное количественное определение - Улучшенная чувствительность и воспроизводимость	- Стоимость выше, чем у традиционных методов ПЦР - Ограниченные возможности мультиплексирования
ПЦР-ПДРФ	Проведение ПЦР для амплификации необходимых фрагментов ДНК с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для определения вариаций в сайтах рестрикции	- Сочетает в себе специфичность ПЦР и ПДРФ-анализа - Позволяет проводить целенаправленный анализ определенных локусов	- Ограничено наличием подходящих сайтов рестрикции - Требуется несколько этапов в рабочем процессе

Одним из самых распространенных молекулярно-генетических методов является метод простой или симплексной ПЦР (simplex PCR) [210]. Симплексная ПЦР – это полимеразная цепная реакция, проводимая с одной парой праймеров [129, 155]. Симплексная ПЦР позволяет идентифицировать ДНК одного или нескольких видов животных, но для идентификации нескольких видов необходимо подбирать универсальные праймеры, амплифицирующие фрагменты разной длины.

Например, в работе исследователей из Чешской Республики описана валидация методики ПЦР на сырах из молока мелких жвачных животных зарубежного происхождения для определения добавления коровьего молока [161]. Однако не всегда существует возможность создать универсальные праймеры, позволяющих идентифицировать ПЦР-продукты. В связи с этим, мультиплексная ПЦР (Multiplex PCR) стала более распространенным методом, поскольку основана на одновременном использовании несколько пар праймеров в одной реакции.

Так в работе Deng с коллегами из Китая с помощью дуплексной ПЦР определяли идентификацию четырех видов животных – *Bos taurus* (домашний бык), *Camelus bactrianus* (двугорбый верблюд), *Equus caballus* (домашняя лошадь) и *Capra hircus* (домашняя коза) в промышленных молочных продуктах и бинарных молочных смесях [105]. Ученые из Кипра разработали протокол триплексной ПЦР для дифференциации близкородственных видов домашнего скота: *Bos taurus*, *Capra hircus* и *Ovis aries* в молоке, йогуртах и сырах [139]. К недостаткам качественной ПЦР следует отнести отсутствие количественного определения целевой ДНК [121, 146, 152, 161].

В отличие от качественной ПЦР, метод ПЦР-РВ позволяет проводить количественную оценку. При этом метод основан на применении интеркалирующих красителей, способных связываться с ДНК или гибридизации дополнительных олигонуклеотидов, меченых флуорофором [147]. До настоящего времени были предложены анализы ПЦР-РВ для выявления количественной оценки коровьего молока в сыре и в козьем молоке.

Стоит отметить, что методы, основанные на ПЦР, имеют потенциал в решении проблемы фальсификации пищевых продуктов [152]. В научных трудах описываются различные методики мультиплексных ПЦР. Существенными преимуществами мультиплексных анализов считаются одновременная детекция ДНК разных видов, снижение себестоимости реагентов и расходных материалов и времени проведения экспериментов [124].

В 2019 году китайские ученые предложили триплексную ПЦР-РВ для обнаружения ДНК в молочных и мясных продуктах [123]. В статье Agrimonti et al. тестирование молока и молочных продуктов для количественного определения коровьей ДНК проводилось на основе квадруплексной ПЦР-РВ [80].

В статье Cutarelli et al. (2021) описан метод капельной цифровой ПЦР, как надежный инструмент для обнаружения наличия коровьего молока в традиционном итальянском сыре моцарелла [101]. В работе Mininni et al. (2009) проводили ПЦР-РВ для детекции компонентов коровьего молока в сырах из козьего и овечьего молока [166].

Следует подчеркнуть, что количество публикаций из России оказалось крайне незначительным, несмотря на международный характер проблемы фальсификации в молочной индустрии. Так в исследовании российских ученых для оценки видоспецифичности ДНК молока был применен метод ПЦР-ПДРФ, позволяющий проводить ДНК-аутентификацию коровьего, козьего и овечьего молока и продуктов на их основе [206]. ДНК-диагностика генетического полиморфизма является важной областью в селекции домашнего скота [31].

Развитие постгеномных технологий и методологической базы определения видовой принадлежности пищевых продуктов представляют собой перспективное научное направление. В связи с этим, планирование и организация научно-исследовательских работ требует предварительного патентного поиска с целью выявления актуальных разработок в области идентификации пищевых продуктов.

Для выполнения данной задачи был проведен анализ в базе данных ФИПС (<http://www1.fips.ru>) [53]. Проведенный анализ выявил следующие наиболее

значимые научные изобретения в области определения видового состава пищевых продуктов, защищенных российскими патентами (таблица 1.4).

Таблица 1.4 – Информация о патентах в области видовой идентификации пищевых продуктов

№ патента	Дата публикации	Краткое описание	Авторы	Ссылка
RU2560579C2	2015.08.20	Изобретение относится к области биотехнологии и представляет собой набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации ДНК животных (свинья, бык, курица, овца, индейка, мышь, крыса, собака, кошка) и ДНК человека в сухих или консервированных кормах для животных и в сырых или подвергшихся кулинарной обработке мясных продуктах.	О. В. Прусакова, К. А. Глухова, И. П. Белецкий	[39]
RU2678090C1	2019.01.23	Изобретение относится к аналитической химии и может быть использовано для контроля аутентичности и качества вареных колбасных изделий. Для этого проводят двумерный электрофорез в полиакриламидном геле исследуемого изделия и эталонного образца с последующим сравнением маркерных белков в полученных электрофореграммах, которые идентифицируют масс-спектрометрически после извлечения из полиакриламидного геля.	Л. И. Ковалев, М. А. Ковалева, Н. Л. Вострикова, И. М. Чернуха	[40]
RU2694713C1	2019.07.16	Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ идентификации видовой принадлежности баранины и говядины в	Д. В. Малышев, О. Ю. Черных, А. А. Котельникова, И. М. Донник, А. А. Лысенко, Р. А. Кривonos, В. Н. Шевкопляс,	[41]

		продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах методом полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени.	А. Г. Кощаев, Л. А. Дайбова, М. И. Гулюкин, К. А. Лайшев, Ю. А. Юлдашбаев, С. А. Мирошников, П. В. Шаравьев, М. П. Семенов, А. В. Молчанов, В. А. Баннов, Ю. Д. Дробин	
RU2702858C1	2019.10.11	Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой тест-систему для идентификации видовой принадлежности баранины и говядины в продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах.	О. Ю. Черных, А. А. Котельникова, В. А. Баннов, И. М. Донник, А. А. Лысенко, Р. А. Кривонос, В. Н. Шевкопляс, А. Г. Кощаев, Л. А. Дайбова, Д. В. Малышев, И. М. Дунин, Х. А. Амерханов, В. И. Дорожкин, К. В. Племяшов, А. А. Бахарев, С. Н. Коломиец, А. С. Кривоногова, Ю. Д. Дробин	[42]

На российском рынке представлен ряд коммерчески доступных наборов реагентов для детекции видоспецифичных молекулярных ДНК-маркеров в продукции животноводства. Среди них можно отметить следующих производителей (таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Основные производители наборов реагентов для проведения видовой идентификации

Производитель	Название набора реагентов	Вид/род определяемого животного	Характеристика набора реагентов
НекстБИО	АмплиПрайм Говядина / Баранина / Конина	<i>Bos taurus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Equus caballus</i>	Выявление целевой ДНК методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме «реального времени»

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора	БИГ. Выявление ДНК митохондриального генома жвачных животных	род <i>Bos</i> (Настоящие быки), род <i>Ovis</i> (Бараны)	Выявление целевой ДНК в биологическом материале методом ПЦР с ГФЛ-детекцией
Научно- производственная компания «Эврика»	ДНК коровы, тест- система Эврика PCR0102-50 для количественного определения методом РТ-ПЦР	<i>Bos taurus</i>	Количественное определение целевой ДНК в продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах методом ПЦР-РВ
«ВЕТ Фактор»	ПЦР-Баранина- Говядина-Фактор	<i>Ovis aries</i> , <i>Bos taurus</i>	Определение видовой принадлежности тканей жвачных животных методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени
Лабреактив	Тест-системы BioKits F.A.S.T. для качественной идентификации видов мяса (скрининг)	<i>Bos taurus</i> , <i>Ovis aries</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Sus scrofa</i>	Идентификация видов мяса ИФА-сэндвич тестами, обеспечивающими чувствительное и селективное качественное определение происхождения видов мяса, мясных продуктов и кормов
R-Biopharm AG	S6126 SureFood® ANIMAL ID 4plex Говядина/ Конина/ Свинина+IAAC	<i>Bos taurus</i> , <i>Equus caballus</i> , <i>Sus scrofa</i>	Тест определяет целевую ДНК методом ПЦР-РВ

Представленные наборы реагентов позволяют выявлять видовой состав пищевых продуктов (сырье, корм, мясные продукты и др.).

Помимо ПЦР-технологий, к настоящему времени активно развиваются и совершенствуются другие молекулярно-генетические методы. К примеру, метод RPA (рекомбиназная полимеразная амплификация) используется для идентификации примесей растительного и животного происхождения в сухом козьем молоке [211, 222].

Кроме того, молочные продукты тестируют методом петлевой изотермической амплификации (LAMP) [145]. Так Yu et al. (2021), разработали чип на основе LAMP, взяв последовательности генов *coi* и *cytb*, для одновременного выявления уникальных генетических локусов коров, коз, яков, верблюдов и лошадей в различных смесях молока [218].

Анализ кривых плавления с высоким разрешением (HRM-анализ) позволяет проводить генотипирование различных вариантов последовательностей ДНК.

Методы на основе HRM-анализа позволяют определить фальсификацию сыров, выработанных из различных видов молока и т.п. [120].

В то же время, применение нескольких вариантов аналитических и молекулярно-генетических методов позволяет более точно идентифицировать состав молочной продукции. Так в статье Liao J. et al. в 2017 году описано комбинированное использование методов ПЦР и ПЦР-РВ для выявления примесей коровьего молока в образцах сухого козьего молока [152]. В работе Lopez-Calleja et al. применили молекулярные (ПЦР) и иммунохимические методы (ИФА) с помощью маркеров и антител против 12S рРНК и гена β -казеина, соответственно, для обнаружения коровьего молока в сырах из козьего и овечьего молока [154].

В статье Wang et al. ученые из Китая методами LAMP и ПЦР оценивали уровень фальсификации козьего молока коровьим молоком, при этом праймеры были комплиментарны последовательности гена цитохрома b [209]. В работе Tsirigoti et al. ученые из Греции анализировали сыры и йогурты, полученные от жвачных животных, благодаря совместному применению триплексной ПЦР и серологических тестов для подтверждения происхождения молока [203]. В частности, комбинированный подход на основе количественной ПЦР и HRM-анализа позволяет анализировать профили кривых плавления и амплификации фрагментов целевой ДНК в молочной продукции, полученной от коров, буйволов, коз, овец и т.д. [121].

К настоящему времени ученые задумываются над созданием и совершенствованием новых аналитических методов. В работе Bougadi et al. (2020) создали биосенсор для проверки аутентичности продовольственных товаров на основе наночастиц золота и гибридизации с амплифицированными целевыми ПЦР-фрагментами [94]. В работе Huang вместе со своими коллегами (2023) разработали гибридный метод RPA-CRISPR/Cas12a для выявления фальсификации сухого козьего молока компонентами коровьего молока [130].

Современные молекулярно-генетические методы основаны на использовании генетических маркеров. Генетический (молекулярный) маркер – это ген или участок ДНК с известной локализацией на хромосоме, который связан с

определенным геном/признаком и представляет собой генетический вариант мутации или изменения нуклеотидной последовательности. При этом генетический маркер может включать как однонуклеотидные замены оснований в нуклеотидах (однонуклеотидный полиморфизм), так и целые последовательности — минисателлиты, микросателлиты и т.п.

В современных молекулярно-генетических исследованиях используются праймеры и зонды, разработанные на основе митохондриальных ДНК-последовательностей (мтДНК) и ядерных [82]. мтДНК представляет собой двуцепочечную молекулу, включающую область D-петли и 37 генов (13 генов синтезируют полипептиды, 22 гена кодируют тРНК и 2 гена синтезируют 12S и 16S рРНК). Так как в мтДНК высокая скорость накопления мутаций, передача наследственной информации происходит по материнской линии, а также отсутствуют интроны и рекомбинационные процессы, изначально данный вид нуклеиновых кислот служил основой для проведения филогенетических исследований и оценки генетического разнообразия [215].

Однако исследования видовой аутентификации были направлены на разработку методов ПЦР, позволяющих амплифицировать митохондриальные гены для обнаружения коровьей ДНК в продуктах из молока других видов животных (буйволы, козы, овцы и т.д.) [101, 109, 121, 201]. Выбор данных молекулярных маркеров обусловлен значительным числом митохондрий в соматических клетках, что обеспечивает чувствительность вышеуказанных методов и потенциальные преимущества для дифференциации видов животных [109, 138, 146, 158, 201]. Важно отметить, что наиболее распространенные молекулярные мишени мтДНК для дифференциации видов — это участки цитохрома *b* (*cytb*) и D-петли [101, 161, 171].

К примеру, в научной работе Pinto и др. анализировали итальянские сыры из буйволиного молока методом ПЦР путем амплификации коровьего гена *cytb* [110]. Согласно исследованиям, проведённым Ganopolous et al. (2013), Nazra et al. (2016) Tsirigoti et al. (2020), фрагмент D-петли часто выбирают для молекулярно-генетического определения содержания коровьего молока в козьем молоке и

продуктах на его основе (йогурт, сыр) [120, 203, 129]. Помимо этого, в научных работах описаны результаты исследований, основанных на разработке праймеров, комплементарных фрагменту D-петли, для скрининга и выявления фальсификации продуктов из буйволиного и других видов молока [128, 202].

В научных исследованиях по аутентификации пищевых продуктов ряд авторов используют другие генетические маркеры, такие как рибосомальные гены 12S рРНК [126, 152, 154, 157], 16S рРНК и гены цитохромоксидазы *coi*. Так Khanzadi et al. использовали генные мишени 12S и 16S рРНК для выявления добавления козьего и коровьего молока в йогурты и сыры на основе овечьего молока [144]. Аналогичные генетические маркеры применили Tuncay et al., чтобы определять состав молока, полученного от *Ovis aries*, *Capra hircus* и *Bos taurus* [204].

Ученые из Таиланда использовали методы КЭ и прямой ПЦР для идентификации генов *coi* и *cytb* в молоке тех же видов сельскохозяйственных животных [97]. Напротив, Sangthong et al. разработали набор праймеров, направленных на амплификацию фрагментов генов *cytb* и 16S рРНК, для проверки видового состава пищевых продуктов [189]. Помимо классических вышеуказанных маркеров мтДНК, в научной литературе описано применение других генных мишеней.

Например, китайские ученые успешно применили гены *ATP-6* и *ATP-8* домашнего скота для обнаружения сухой, коровьей сыворотки в продуктах из козьего молока [221]. Более того, молоко анализируют методом ПЦР-РВ, основанном на амплификации митохондриальных генов НАДН-дегидрогиназы и рРНК [205].

В научных исследованиях также обсуждается целесообразность применения ядерных генетических маркеров. К примеру, исследователи из Швейцарии выбрали специфические праймеры и олигонуклеотидные зонды, ориентированные на ядерные молекулярные маркеры для определения видового происхождения в сырных матрицах [183]. В 2019 году Cosenza et al. опубликовали работу, в которой предложили элемент SINE в промоторной области гена *LALBA*, в качестве

видоспецифического маркера для идентификации нуклеиновых кислот в молочной продукции [100].

Ученые из России выбрали в качестве ядерного ДНК-маркера ген к-казеина (*CSN3*) для видовой идентификации молока-сырья в продукции жвачных животных [206]. В определенных научных трудах встречается универсальный подход, основанный на одновременном анализе двух групп указанных молекулярных маркеров. К примеру, в работе Mininni et al. выбрали гены ядерной ДНК (ген миостатина (*Myo*), рибосомальный 18S рНК) и гены мтДНК (ген *cytb* и 16S рНК) для определения состава сложных сырных матриц [166].

В данной работе для выполнения ДНК-тестирования в качестве молекулярных мишеней выбрали участки мтДНК (16S рНК, D-петля) представителей жвачных (*Bos taurus* и *Capra hircus*). Гены рНК являются важнейшими компонентами рибосомы, представляющими собой рибонуклеопротеиновые комплексы, обеспечивающие белковый синтез. Рибосомы состоят из двух субъединиц (большой 50S субъединицы и малой 30S субъединицы) у прокариот.

При этом 50S субъединица содержит 23S, 5S рНК и более 30 белков, а 30S субъединица содержит 16S рНК и около 20 белков. Среди трех генов рНК ген 16S рНК наиболее часто применяется в молекулярно-генетических исследованиях [173, 174]. Данный ген включает 9 гипервариабельных областей, разделенных высококонсервативными участками.

Изначально ген 16S рНК применялся для филогенетических исследований [216]. Тем не менее, последовательности данного митохондриального маркера также используются для видовой идентификации [181]. D-петля (D-loop) представляет собой трехцепочечную структуру ДНК, расположенную в некодирующей области митохондриального генома [169]. Данный участок включает регуляторные элементы, ответственные за ключевые молекулярные процессы (репликация мтДНК, экспрессия генов и т.п.) [190].

Заключение

Проведенный анализ научно-технической литературы показал значимость проблемы фальсификации в пищевой индустрии. Недобросовестная предпринимательская практика фальсификации молочных продуктов обусловлена экономическими и другими факторами (дисбаланс спроса и предложения, сезонность производства, разница в стоимости молочного сырья и др.). Однако незадекларированное добавление различных примесей представляет значительную угрозу здоровью потребителей.

В целях контроля качества и безопасности продукции животноводства, а также защиты интересов и прав потребителей, научные технологии постоянно совершенствуются для проверки подлинности пищевых продуктов. Тем не менее, многие из существующих методов аутентификации пищевых продуктов (спектральные, иммунологические и др.) обладают рядом ограничений, связанных с высокой стоимостью, низкой чувствительностью и др. Наиболее перспективными способами выявления видового состава молока и молочной продукции являются молекулярно-генетические методы, в особенности ПЦР-анализы, благодаря их высокой эффективности, специфичности и чувствительности.

На современном этапе в Российской Федерации отсутствуют коммерчески доступные наборы реагентов (тест-системы), позволяющие идентифицировать видовой состав молочного сырья. При этом количество отечественных публикаций, рассматривающих проблемы видовой фальсификации пищевой продукции также незначительно.

В связи с этим, разработка быстрых и точных методов молекулярно-генетической идентификации представляет собой перспективное направление научных исследований. Их внедрение позволит на законодательном уровне минимизировать случаи незаконной фальсификации и совершенствовать системы контроля и мониторинга производства в молочной индустрии.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Методология выполнения работы

Работа выполнена в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» в период 2022 – 2025 гг. Общая схема проведения теоретических и экспериментальных исследований показана на рисунке 2.1.

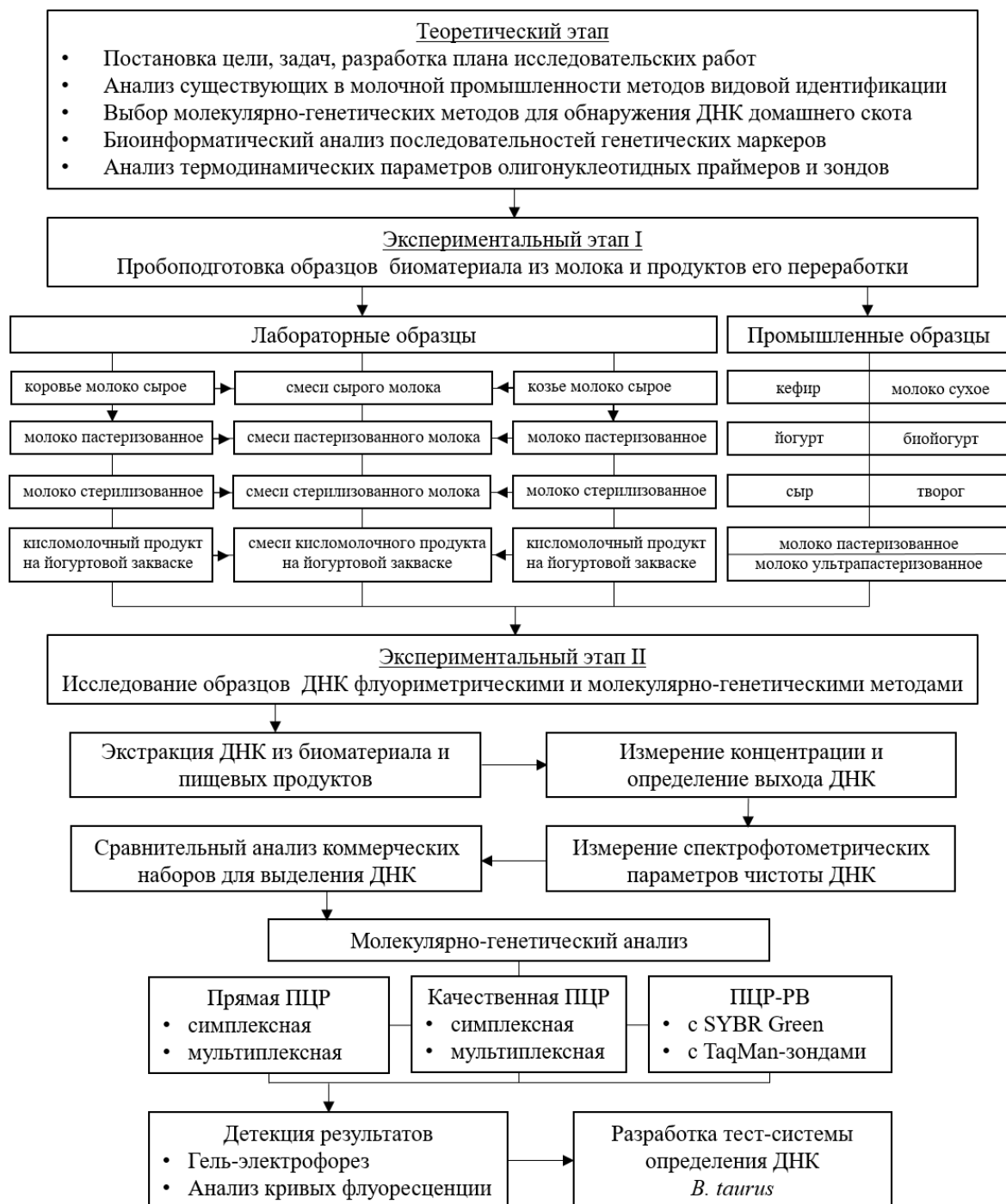


Рисунок 2.1 – Общая схема проведенных исследований

2.2 Объекты исследований

В качестве объектов использовались молоко сырое цельное сборное коровье (Джерсийская порода), молоко сырое цельное сборное козье (Зааненская и Нубийская порода) фермерского производства и приготовленные на их основе бинарные молочные смеси, а также полученные из них продукты (молоко пастеризованное, стерилизованное, кисломолочные продукты на йогуртовой закваске). Помимо этого, проводили анализ промышленных молочных продуктов (молока пастеризованного, ультрапастеризованного, сухого цельного (СЦМ), йогурта, биойогурта, сыра, творога и кефира. Образцы молока и продуктов на его основе из разных источников собирали и хранили при температуре -20°C до проведения последующих экспериментов.

2.3 Пробоподготовка лабораторных проб молока и продуктов его переработки

Измерение показателя ССК в сыром козьем и коровьем молоке проводили с помощью анализатора соматических клеток (DCC) (Фирма «GMU Tumba Delaval International AB, Швеция»). Лабораторные смеси сырого козьего и коровьего молока были получены в следующих пропорциях: 100%, 99,9%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,1% и 0% (козьего молока).

Пастеризованное молоко, полученное от обоих видов животных, получали при температуре равной $(90\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в течение 5 минут на водяной бане. Стерилизованное молоко жвачных животных было приготовлено путем автоклавирования при температурном режиме равном $(121\pm 2)^{\circ}\text{C}$, давлении - 0,15МПа в течение 3 минут в автоклаве («NB-1100», Южная Корея).

Лабораторные смеси пастеризованного; стерилизованного молока, кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске были получены в тех же пропорциях для последующих исследований. Приготовление жидких йогуртовых заквасок включало охлаждение стерилизованного молока с последующим внесением культур бактериальных штаммов (*Str.thermophilus*, штамм бкб и

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, штамм L37/7) и инкубирование в термостате при температуре (40 ± 2) °C в течение 15 часов.

Далее к модельным смесям пастеризованного молока добавляли 5% по объему смесь заквасок в соответствующих пропорциях и ставили в термостат для сквашивания при температуре (40 ± 2) °C в течение 4 часов. Полученные кисломолочные продукты на йогуртовой закваске из смесей пастеризованного молока охлаждали в холодильной камере при температуре (4 ± 2) °C в течение 15 часов.

2.4 Экстракция ДНК из пищевых продуктов и биологических материалов

Выделение ДНК из образцов молочной продукции проводилось с помощью коммерчески доступных наборов реагентов: «ДНК-сорб-С-М» (набор №1) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) «ДНК-Экстран-2» (набор №2) (ООО «НПФ Синтол», Россия), «Сорб-ГМО-Б» (набор №3) (ООО «НПФ Синтол», Россия), «ГМО-МагноСорб» (набор №4) (ООО «НПФ Синтол», Россия) и «К-Сорб» (набор №5) (ООО «НПФ Синтол», Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Лизис образцов протеиназой происходил с последующей элюцией в конечном объеме 45 мкл для набора «ДНК-сорб-С-М», 50 мкл для наборов «ДНК-Экстран-2», «К-Сорб» и 150 мкл для наборов «Сорб-ГМО-Б», «ГМО-МагноСорб» соответственно.

Пробоподготовка жидких образцов происходила следующим образом: пробы объемом 2 мл центрифугировали при 10 000 g в течении 5 минут, после чего супернатант удаляли с использованием вакуумного отсасывателя. Полученный осадок использовали для экстракции ДНК.

Пробоподготовка твердых образцов (сыры) включала центрифугирование пробы массой 400 мг с последующим удалением надосадочной жидкости. Пробоподготовка сухих образцов (СЦМ) включала использование 100 мг сухого вещества для последующего извлечения нуклеиновых кислот.

2.5 Измерение качественных и количественных параметров образцов ДНК

Измерение концентрации образцов ДНК проводили на флуориметре Qubit 4 («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл. Определение спектрофотометрических показателей чистоты образцов ДНК проводилось путем измерения оптической плотности при длинах волн 230, 260 и 280 нм с использованием микроспектрофотометра Nano-500 («Allsheng», США) в объеме 2 мкл.

2.6 Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозных гелях

Для оценки уровня фрагментации препаратов ДНК, экстрагируемой из объектов исследования брали 15 мкл образцов ДНК путем объединения исследуемых точечных проб, с добавлением 5 мкл красителя 4X бромфеноловый синий (ЗАО «Евроген», Россия). Аналитический электрофорез с целью качественной оценки образцов ДНК и полученных ампликонов проводился при напряжении электрического поля 7 В/см геля в течение 1 часа с применением маркеров длин ДНК «1 kb DNA Ladder» и «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия) в 1-2% агарозном геле (VWR International LLC, США), предварительно окрашенном раствором бромистого этидия. Документирование осуществляли с использованием системы гель-документирования «Vilber E-Box-CX5.TS» (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

2.7 Биоинформатический анализ

Глобальные выравнивания последовательностей нуклеиновых кислот осуществляли с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша в модификации, обеспечивающей проведение выравнивания протяжённых последовательностей. Локальные выравнивания и поиск гомологичных последовательностей в базе данных GeneBank производили с использованием алгоритма BLAST. Разработка праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагментов ДНК жвачных

осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST [217].

Специфичность праймеров *in silico* проверялась с использованием платформы UCSC Genome Browser [140] Расчёт термодинамических параметров праймеров выполнен с использованием пакета ПО Vector NTI 11.5. Локализация сайтов связывания олигонуклеотидов с участками фрагментов ДНК *Bos taurus*, *Capra hircus* и вектора pAL2-T проводилась с помощью платформы benchling (Компания Benchling, США). Последовательности используемых и разработанных олигонуклеотидных праймеров и зондов TaqMan приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды

Название	Последовательность	T _a , °C	Мишень	Длина ампликона, п.н.	Источник
T	ACCCTCTCGACTAAACAA CCAAGATAG		S pPHK <i>B taurus</i>	583	Deng et al. (2020)
B T	TGGGGCTAGGAGTTAATC ATTTGTTG				
C H	ACTCCACAAGCTTACAGA CATGCCA		D-петля <i>C hircus</i>	184	
C H	GAAGGCTGTATGTCCGCG TTATATG				
B T	CCTCTCGACTAAACAACC AAGAT		S pPHK <i>B taurus</i>	111	Данная работа
B T	GTTCCCTTGCGGTACTTTC T				
16_BT_probe	/HEX/- AGGAGATAGAAATCTAAG TACGGCGCT-/BHQ-2/				
D_CH_for	GCCAACAACCCACACGTA TAA		D-петля <i>C hircus</i>	114	
D_CH_rev	TAGGCGAGCGGTGTAATG TA				
D_CH_probe	/FAM/- CACACAAACGCCAACACC ACACAA-/BHQ-1/				
vko_P_for	GCGGATAACAATTTCACACAGG		Plac pAL2-T	94	
vko_P_rev	CGTTGGATGCATAGCTTGAGTA				
vko_P_probe	Cy5/AGCTATGACCATGAT TACGCCAAGCT/BHQ2				

2.8 Симплексная ПЦР

Молекулярно-генетическое тестирование молочных матриц на наличие добавления коровьего молока в лабораторных и промышленных молочных продуктах проводили с помощью праймеров ВТ-F и ВТ-R. Реакционная смесь для амплификации участка 16S рРНК включала 17 мкл воды, свободной от нуклеаз (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл праймера ВТ-F (10мМ), 1 мкл праймера ВТ-R (10мМ), 5 мкл окрашенной реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл образца ДНК.

Параметры условий для проведения ПЦР: исходная денатурация 95°C 5 минут (1 цикл); денатурация при 95°C 15 секунд; отжиг праймеров при 57°C 15 секунд; элонгация при 72°C 30 секунд (35 цикл); финальная элонгация при 72°C 10 минут (1 цикл). Теоретически ожидаемая длина целевого фрагмента для *Bos taurus* составляет 583 п.н.

Тестирование молочных матриц методом качественной ПЦР на заявленное присутствие козьего молока в лабораторных и промышленных молочных продуктах проводили с применением праймеров СН-F и СН-R. Реакционная смесь для амплификации участка D-петли включала 17 мкл воды, свободной от нуклеаз (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл праймера СН-F (10мМ), 1 мкл праймера СН-R (10мМ), 5 мкл окрашенной реакционной смеси 5X ScreenMix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл образца ДНК.

Параметры условий для ПЦР, соответствовали программе для амплификации фрагмента гена 16S рРНК. Теоретически ожидаемая длина целевого фрагмента для *Capra hircus* составляет 184 п.н. Все качественные симплексные ПЦР-анализы проводились на приборе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США).

2.9 Мультиплексная ПЦР

Исследование лабораторных бинарных молочных смесей проводилось путем мультиплексной ПЦР с использованием 2 пар праймеров к генным мишеням мтДНК коров и коз. Реакционная смесь для дуплексной ПЦР включала 15 мкл воды, свободной от нуклеаз (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл праймера ВТ-F

(10мМ), 1 мкл праймера ВТ-Р (10мМ), 1 мкл праймера СН-Ф (10мМ), 1 мкл праймера СН-Р (10мМ), 5 мкл 5Х окрашенной реакционной смеси ScreenMix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл образца ДНК.

Параметры условий для проведения амплификации: исходная денатурация 95°C 5 минут (1 цикл); денатурация при 95°C 15 секунд; отжиг праймеров при 57°C 15 секунд; элонгация при 72°C 30 секунд (35 цикл); финальная элонгация при 72°C 10 минут (1 цикл). Теоретически ожидаемые длины фрагментов для *Bos taurus* и *Capra hircus* составляют 583 и 184 п.н. соответственно. Мультиплексная ПЦР была выполнена в амплификаторе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США).

2.10 Прямая ПЦР

Метод прямой ПЦР для амплификации участков мтДНК домашней коровы был проведен с использованием 20 мкл микса «2,5Х Mas HFBL MIX-3510» (ПКЗАО «Диалат Лтд», Россия), 1 мкл праймера ВТ-Ф (10мМ), 1 мкл праймера ВТ-Р (10мМ), 26 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия) и 2 мкл биологического материала (бинарные смеси сырого молока двух видов животных) в конечном объеме реакционной смеси, равном 50 мкл.

Программа амплификации состояла из начальной денатурации при 98 °C в течение 5 мин, 35 циклов вида 98 °C – 10 сек, 64 °C – 30 сек, 72 °C – 20 сек, и финальной элонгации при 72 °C в течение 10 минут. Прямая ПЦР была проведена в амплификаторе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США).

2.11 ПЦР-РВ с SYBR Green

ПЦР-РВ для анализа фрагмента гена 16S рРНК выполнили с помощью 1 мкл праймера ВТ-Ф (10мМ), 1 мкл праймера ВТ-Р (10мМ), 5 мкл микса «5Х qPCRmix-NS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия), 17 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл раствора ДНК в конечном объеме 25 мкл. ПЦР-РВ анализ проводился в амплификаторе LightCycler 96 («Roche», Швейцария). Программа амплификации включала исходную денатурацию при 95 °C в течение 5 мин, 45

циклов вида 95 °С – 15 сек, 57 °С – 15 сек, 72 °С – 30 сек, и финальную элонгацию при 72 °С в течение 10 минут.

2.12 Мультиплексная ПЦР-РВ с TaqMan-зондами

Мультиплексный ПЦР-РВ анализ для одновременной амплификации фрагментов участков 16S рРНК коровы и D-петли козы проводили с помощью 1 мкл праймера 16_BT_for (10мМ), 1 мкл праймера 16_BT_rev (10мМ), 0.25 мкл зонда 16_BT_probe (10мМ), 1 мкл праймера D_CH_for (10мМ), 1 мкл праймера D_CH_rev, 0.25 мкл зонда D_CH_probe (10мМ), (10мМ), 5 мкл микса «5X qPCRmix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия), 14,5 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл раствора ДНК в конечном объеме 25 мкл.

Мультиплексный ПЦР-РВ анализ для амплификации фрагментов участков 16S рРНК коровы и участка *Plac* вектора рAL2-T проводили с помощью 1 мкл праймера 16_BT_for (10мМ), 1 мкл праймера 16_BT_rev (10мМ), 0.25 мкл зонда 16_BT_probe (10мМ), 1 мкл праймера vko_P_for (10мМ), 1 мкл праймера vko_P_rev, 0.25 мкл зонда probe_P_vko (10мМ), (10мМ), 5 мкл микса «5X qPCRmix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия), 13,5 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл ВКО (0,0001 нг/мкл вектора рAL2-T) и 1 мкл раствора ДНК в конечном объеме 25 мкл.

Мультиплексная ПЦР-РВ проводилась в амплификаторах LightCycler 96 («Roche», Швейцария) и Rotor-Gene Q («QIAGEN», Германия) в соответствии со следующей программой. Программа для проведения мультиплексной ПЦР-РВ: исходная денатурация 95°С 5 минут (1 цикл); денатурация при 95°С 15 секунд; отжиг праймеров при 62°С 20 секунд; элонгация при 72°С 30 секунд (45 циклов); финальная элонгация при 72°С 10 минут (1 цикл). Теоретически ожидаемые длины фрагментов для *Bos taurus*, *Capra hircus* и вектора рAL2-T составляют 111, 114 и 94 п.н. соответственно.

2.13 Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США) и Statistica 12 (Statsoft, США). Для оценки статистической достоверности применялся непараметрический критерий Краскелла-Уоллиса.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Сравнительный анализ эффективности методов экстракции ДНК из молока и продуктов на его основе

Выход суммарной ДНК из сырого молока в основном определяется содержанием ССК. В соответствии с ГОСТ 31449-2013 [15] и ГОСТ 32940-2014 [16] содержание ССК в коровьем и козьем молоке не должно превышать 400 тыс/мм³ и 1000 тыс/мм³ соответственно. Анализ проб сырого коровьего и козьего молока показал, что показатели ССК находились в пределах нормы и составляли в коровьем молоке $362,67 \pm 29,54$ тыс/мм³, в козьем $835,67 \pm 27,15$ тыс/мм³. ДНК экстрагировали из образцов идентичного биологического материала пятью коммерческими наборами выделения нуклеиновых кислот. При этом для каждого набора реагентов было выделено по 100 образцов ДНК из сырого козьего, пастеризованного, сухого молока, сыра и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске из козьего молока.

Оценка уровня фрагментации препаратов выделенной суммарной ДНК

После экстракции ДНК из молочных продуктов была проведена предварительная оценка фрагментации молекул при помощи электрофоретического анализа проб ДНК, выделенных коммерческими наборами для выделения нуклеиновых кислот. Результаты аналитического электрофореза зафиксировали наибольшее количество высокомолекулярной ДНК при экстракции нуклеиновых кислот из сырого и сухого козьего молока с помощью наборов №1, №2 и №5. Также наличие высокомолекулярной ДНК было зафиксировано при выделении нуклеиновых кислот из сыра с использованием методов №1, №3 и №4.

Наименьшее количество выделенной ДНК обнаружено при экстракции нуклеиновых кислот из пастеризованного молока и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске наборами №3, №4 и №5. Стоит отметить, что при экстракции ДНК из сыра с использованием методов №2 и №3 наблюдаются короткие фрагменты – шмеры. Кроме того, в случае препаратов ДНК, полученных методом высаливания, отмечается наличие шлейфа, включающего фрагментированные нуклеиновые кислоты различного размера (рисунок 3.1).

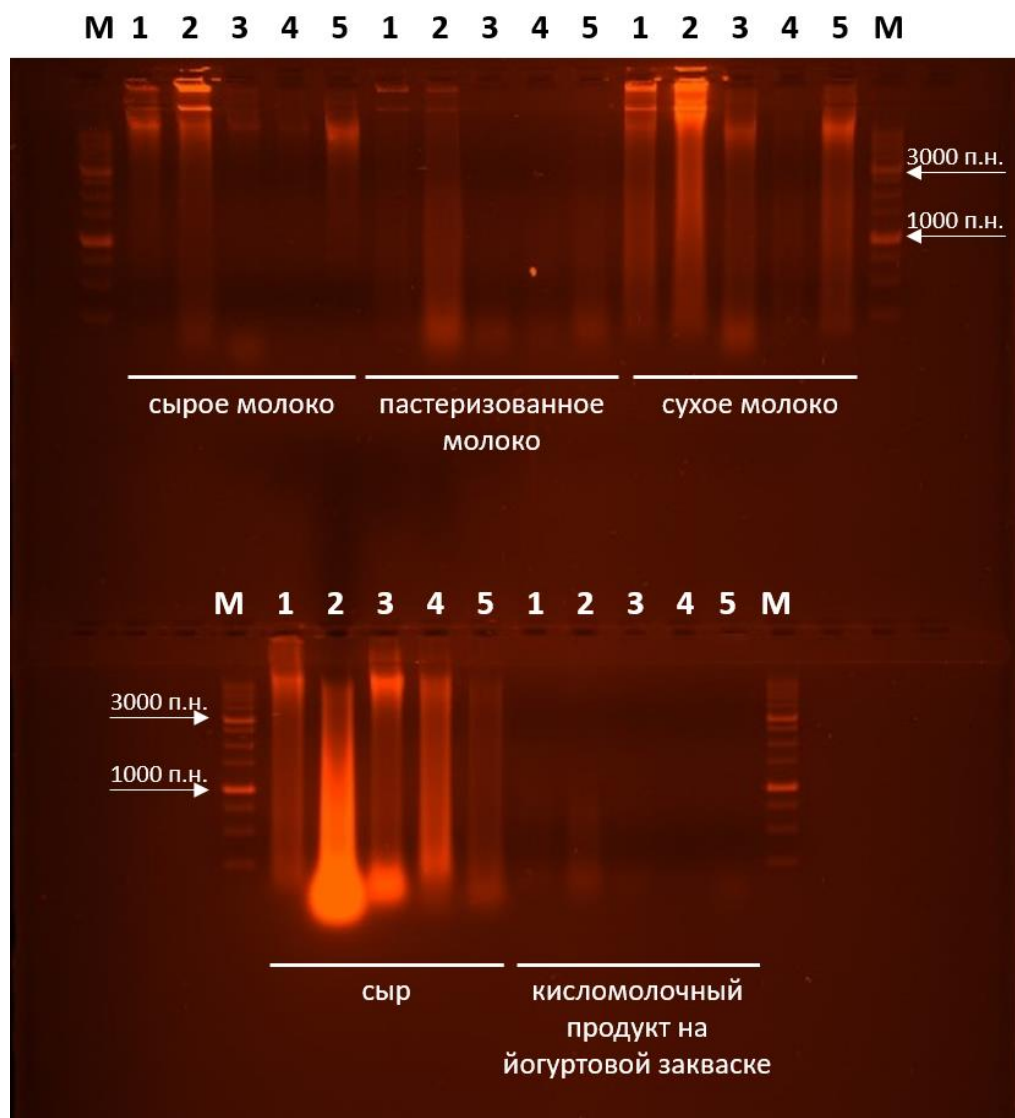


Рисунок 3.1 – Электрофореграмма типовых результатов анализа уровня фрагментирования суммарной ДНК, выделенной из козьего сырого; пастеризованного; сухого цельного молока; сыра и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске из козьего молока наборами №1-5;
М – маркер длин ДНК («1 kb DNA Ladder»)

Оценка общего выхода препаратов экстрагируемой суммарной ДНК

После измерения флуориметрических параметров препаратов нуклеиновых кислот строили графики выхода суммарного экстрагируемой ДНК для каждого продукта. На рисунке 3.2 видно, что в зависимости от вида молока и молочного продукта коммерческие наборы показали различные результаты по данному параметру.

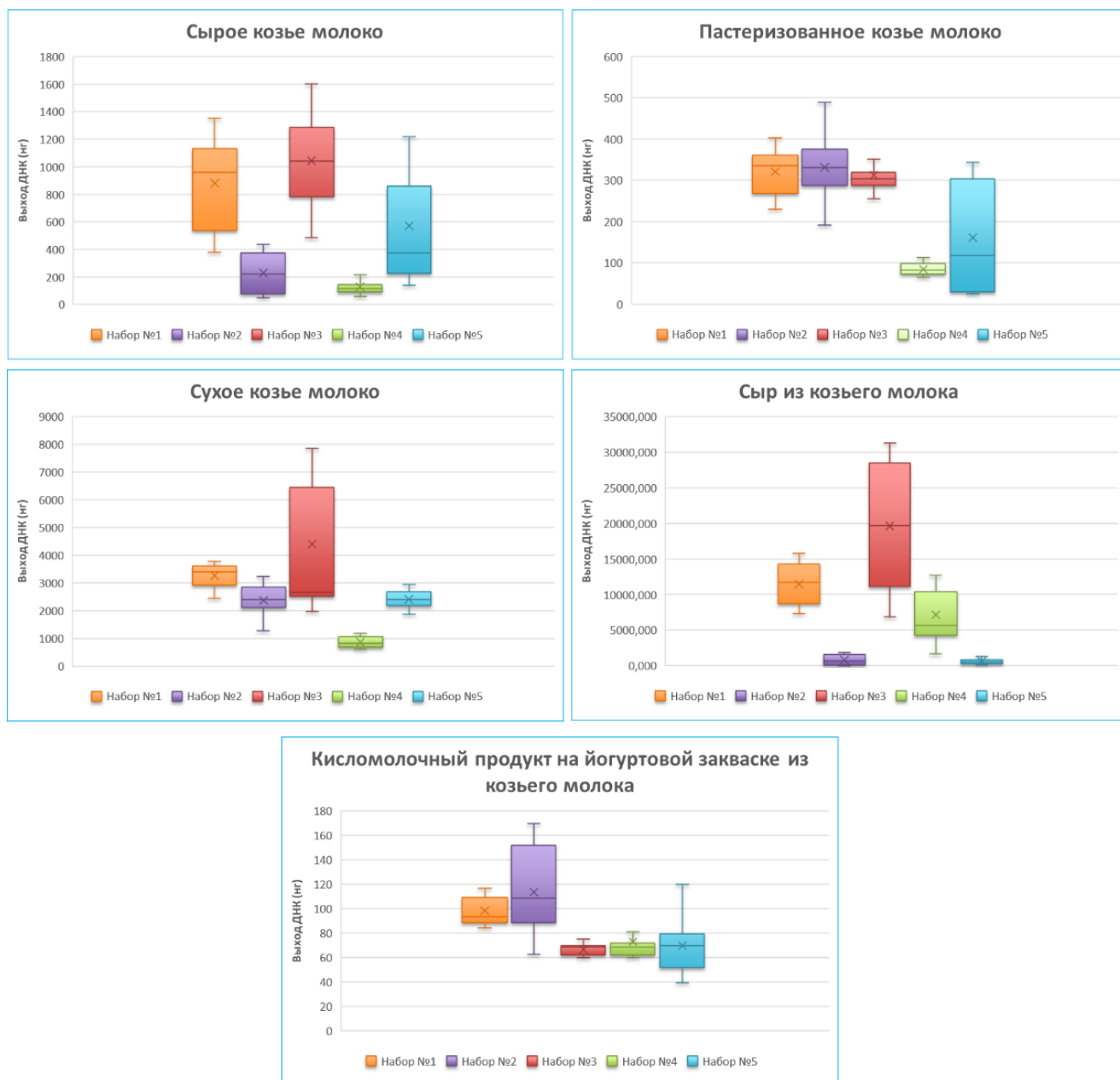


Рисунок 3.2 – Средний выход ДНК, выделенной коммерческими наборами из молочных продуктов

Установлено, что наиболее высокий выход наблюдался при выделении ДНК из сыра, что может быть обусловлено высоким содержанием активно развивающихся микроорганизмов при его созревании и использованием большего объема молока при его производстве. В тоже время самый низкий суммарный выход ДНК был получен при экстракции нуклеиновых кислот из кисломолочного продукта на йогуртовой закваске, что может быть связано со значительной деградацией нуклеиновых кислот, вызванной высоким температурным режимом пастеризации молока, используемого для его приготовления.

Результаты измерения выхода суммарной ДНК показали, что среди всех использованных наборов наибольший средний выход из анализируемых молочных матриц обеспечивали протоколы на основе кремниевых сорбентов (наборы №1 и №3). Протокол на основе высаливания (набор №2) показал относительно невысокий уровень выхода ДНК, за исключением пастеризованного молока ($331,44 \pm 91,27$ нг) и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске ($113,53 \pm 34,24$ нг).

Следует отметить, что набор №4 демонстрировал самый низкий средний выход ДНК со всеми тремя видами молока по сравнению с остальными наборами. Как и протокол на основе магнитных частиц, набор №5 показал более низкий выход ДНК при её экстракции из пастеризованного и сухого молока.

Более того, сравнение значений общего выхода ДНК из сыра показало, что наименее эффективными при работе с данным типом образцов были наборы №2 и №5. Результаты измерения выхода суммарной ДНК показали, что все использованные наборы в целом пригодны для выделения нуклеиновых кислот из козьего молока и продуктов на его основе.

Оценка чистоты препаратов экстрагируемой суммарной ДНК

В ходе измерений коэффициентов поглощения при длинах волн 260 и 280 нм установлено, что метод органической экстракции (набор №3) показал наилучшие результаты получения высокоочищенных образцов ДНК из анализируемых молочных продуктов. Высокие средние значения коэффициента $A_{260}/_{280}$ при использовании данного протокола были выше эталонного ($\sim 1,8$), что свидетельствует о надлежащем качестве выделенной ДНК с минимальным содержанием белковых загрязнений (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Определение коэффициентов $A_{260}/_{280}$, $A_{260}/_{230}$ проб ДНК

Продукт	Коэффициент	Набор №1	Набор №2	Набор №3	Набор №4	Набор №5
Сырое козье молоко	$A_{260}/_{280}$	$1,65 \pm 0,17$	$1,02 \pm 0,07$	$1,96 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,07$	$1,62 \pm 0,25$
	$A_{260}/_{230}$	$0,05 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,49$	$0,87 \pm 0,56$	$0,37 \pm 0,07$	$0,5 \pm 0,38$
Пастеризованное	$A_{260}/_{280}$	$1,67 \pm 0,12$	$1,3 \pm 0,19$	$1,83 \pm 0,11$	$1,48 \pm 0,12$	$1,17 \pm 0,11$

козье молоко	A260/230	0,03±0,01	0,35±0,14	1,16±0,39	0,39±0,08	0,25±0,06
Сухое козье молоко	A260/280	1,88±0,01	1,34±0,25	1,91±0,05	1,46±0,05	1,75±0,21
	A260/230	0,96±0,37	0,39±0,16	1,76±0,37	0,58±0,25	2,3±3,54
Сыр из козьего молока	A260/280	1,64±0,23	1,16±0,08	1,92±0,16	1,9±0,21	1,18±0,09
	A260/230	0,78±0,48	0,27±0,06	1,73±0,64	1,36±0,33	0,34±0,11
Кисломолочный продукт из козьего молока	A260/280	1,03±0,2	2,02±0,03	1,85±0,11	1,17±0,19	1,03±0,18
	A260/230	0,37±0,29	1,17±0,09	0,49±0,22	0,21±0,05	0,37±0,27

Средние значения показателя A260/280 для трех видов молока составили $1,96\pm0,06$ (сырое), $1,83\pm0,11$ (пастеризованное) и $1,91\pm0,05$ (сухое). В сыре и кисломолочном продукте на йогуртовой закваске коэффициенты A260/280 были $1,92\pm0,16$ и $1,85\pm0,11$ соответственно. В ходе применения других коммерческих наборов были получены препараты ДНК с более низкой степенью чистоты, что видно из результатов измерений показателя A260/280.

Определение коэффициента A260/230 показало, что протокол №3 также позволяет получать более высокочищенные препараты ДНК с высокой степенью очистки от компонентов, используемых для лизиса образцов. В то же время наборы №2, №4 и №5 демонстрировали более низкие значения коэффициента A260/230 после экстракции и очистки образцов.

Набор №1 показал низкую эффективность очистки выделяемой из молочных матриц ДНК, в особенности при работе с сырым ($A260/230\sim0,05\pm0,03$) и пастеризованным козьим молоком ($A260/230\sim0,03\pm0,01$), что может свидетельствовать о наличии в образцах контаминирующих веществ белковой природы. Кроме того, протокол на основе высаливания демонстрировал самые низкие средние значения показателя A260/230 в случае сухого молока ($\sim0,39\pm0,16$) и сыра ($\sim0,27\pm0,06$). При этом средние значения коэффициентов A260/280 и A260/230 для ДНК, полученной из кисломолочного продукта на йогуртовой

закваске, в целом были значительно ниже по сравнению с остальными молочными матрицами.

Таким образом, полученные результаты показывают, что метод фенол-хлороформной экстракции (набор №3) обеспечивал наиболее эффективную очистку как от хаотропных солей, так и от веществ органической и белковой природы. Применение критерия Краскелла-Уоллиса показало наличие значимых различий выхода ДНК, коэффициентов $A_{230}/260$ и $A_{260}/280$ между пятью методами выделения нуклеиновых кислот при уровне значимости (α), равном 0,05 и степени свободы равной 4.

Оценка уровня ингибирования ПЦР в пробах выделенной ДНК

Анализ результатов ПЦР с праймерами CH-F и CH-R методом электрофореза показал, что при использовании в качестве матрицы образцов ДНК, выделенной из сырого козьего молока методом высаливания, в количестве 20% от общего объема реакционной смеси приводит к частичному или полному ингибированию амплификации. Ограничение эффективности синтеза дочерних цепей ДНК также наблюдается в случае использование 20% объема раствора ДНК из козьего пастеризованного и сухого молока, выделенной методом на основе солевого осаждения [66].

Установлено, что в отличие от метода №2, сорбционные методы (набор №1, №3 и №4) не препятствуют синтезу ампликонов целевой длины в исследуемых продуктах. Тем не менее, использование малых объемов вносимой пробы (4% от общего объема реакционной смеси) не оказывает влияния на эффективность синтеза дочерних цепей ДНК, поскольку во всех анализируемых пробах отмечалось накопление амплифицированных фрагментов (рисунок 3.3).



Рисунок 3.3 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР с праймерами СН-F и СН-R с ДНК, выделенной наборами №1-4 из козьего сырого (А), пастеризованного (Б), сухого (В), стерилизованного (Г) молока, сыра (Д) и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске из козьего молока (Е) при добавлении 4% объема раствора ДНК (№ «1») и 20% объема (№ «2»); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Результаты исследования связаны с тем, что использование раствора с более высокой концентрацией ДНК приводит к попаданию в образец большего количества ингибирующих веществ. Данные вещества вероятно присутствовали в исходных образцах в виде ионов кальция или могли быть добавлены в пробы ДНК на этапе выделения. Следовательно, сорбционные методы выделения нуклеиновых кислот демонстрируют значительные преимущества при анализе молока и продуктов его термической обработки.

Кроме того, образцы ДНК из козьего молока-сырья и продуктов его переработки, полученные наборами №1-№5 были также проверены методом ПЦР в режиме реального времени с олигонуклеотидами D_CH_for, D_CH_rev и

D_CH_probe для выявления ампликонов ДНК домашней козы. Установлено, применение набора реагентов №2 может приводить, как и при качественной ПЦР, к снижению эффективности амплификации и появлению ложноотрицательных результатов ПЦР-РВ даже при использовании малых объемов вносимой пробы ДНК (рисунок 3.4).

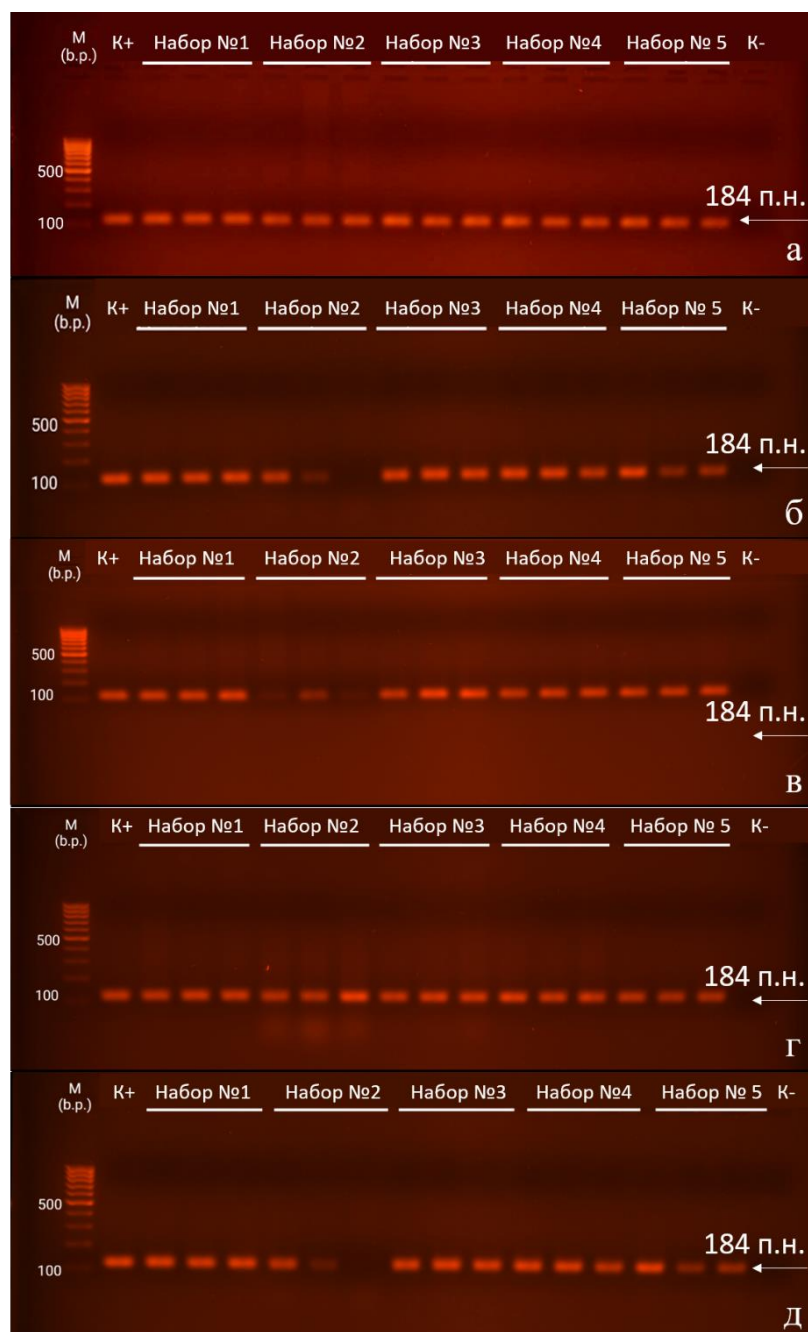


Рисунок 3.4 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР-РВ с праймерами D_CH_for, D_CH_rev и зондом D_CH_probe с суммарной ДНК, выделенной наборами 1-5 из козьего сырого (а), пастеризованного молока (б), СЦМ (в), сыра (г), кисломолочного продукта на йогуртовой закваске из козьего молока (д); «К+» – геномная ДНК козы; «К-» – отрицательный контроль; М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Оценка видового состава образцов выделенной суммарной ДНК

Кроме того, исследуемые продукты были проверены на наличие коровьей ДНК методом качественной ПЦР с использованием двух пар олигонуклеотидных праймеров, комплиментарных участкам мтДНК коровы (ВТ-F, ВТ-R) и козы (СН-F, СН-R) (рисунок 3.5).

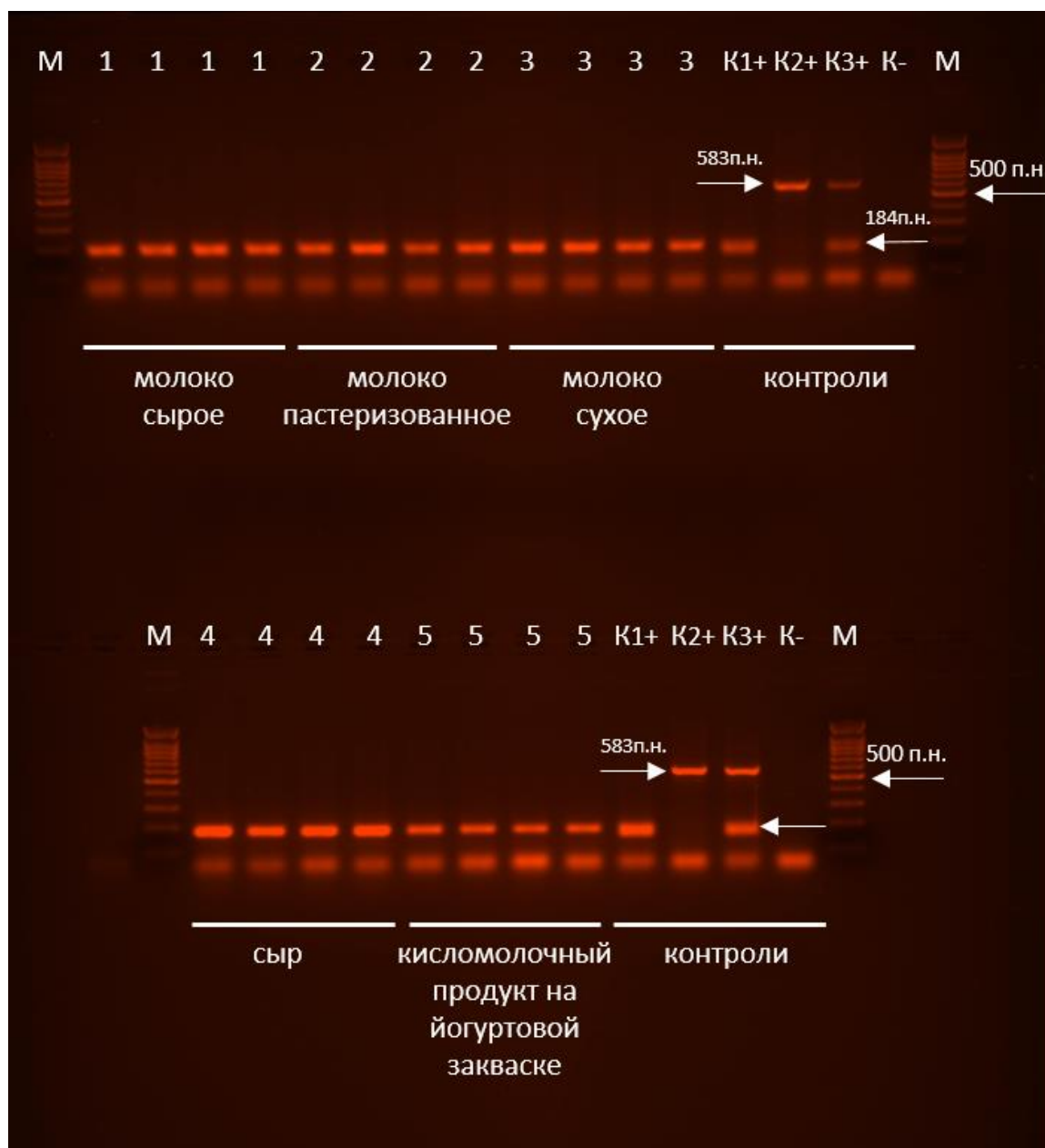


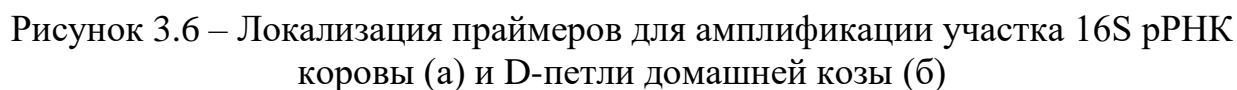
Рисунок 3.5 – Электрофореграмма типовых результатов ПЦР с праймерами ВТ-F, ВТ-R и СН-F, СН-R с суммарной ДНК, выделенной из козьего сырого (1), пастеризованного молока (2), СЦМ (3), сыра (4), кисломолочного продукта на йогуртовой закваске из козьего молока (5); «K1+» – геномная ДНК козы; «K2+» – геномная ДНК коровы; «K3+» – геномная ДНК козы и коровы; «K-» – отрицательный контроль; M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Анализ показал, что все продукты выработаны исключительно из козьего молока, так как во всех пробах наблюдался только ампликон размером 184 п.н., полученный при амплификации ДНК *Capra hircus*. При этом фрагмент, соответствующий продукту амплификации ДНК *Bos taurus* размером 583 п.н. не был обнаружен в анализируемых образцах.

Установлено, что при работе с молочными матрицами сорбционные методы экстракции ДНК обладают рядом преимуществ, по сравнению с методом высаливания, а также позволяют получать высокомолекулярные препараты нуклеиновых кислот. Применение методов экстракции на основе сорбентов позволяет исключить эффект ингибирования и появление ложноотрицательных результатов ПЦР, что играет ключевую роль при определении происхождения продукции из козьего молока.

3.2 Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей ДНК *Bos taurus*, *Capra hircus* и вектора pAL2-T

Благодаря присутствию в любой эукариотической клетке в значительном количестве клеточных органелл (митохондрий), мтДНК представляет собой перспективную мишень для подтверждения видового происхождения молока-сырья и полученной из него продукции. На первых этапах исследования были выбраны пары олигонуклеотидных праймеров, комплиментарных фрагментам мтДНК *Bos taurus* (BT-F + BT-R) и *Capra hircus* (CH-F + CH-R) [105]. С использованием данной панели праймеров проводили видовую идентификацию молока и продуктов его переработки, методами качественной симплексной и дуплексной ПЦР. Локализация вышеописанных олигонуклеотидов представлена на рисунке 3.6.



Для проведения параллельной амплификации и детекции сигнала в режиме реального времени были разработаны олигонуклеотидные праймеры и зонды, обеспечивающие амплификацию видоспецифичных фрагментов мтДНК жвачных и ДНК вектора рAL2-T, выбранного в качестве ВКО. В ходе проведения биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей геномов крупного и мелкого рогатого скота для разработки олигонуклеотидов были использованы последовательности 16S рРНК *Bos taurus* и D-петли *Capra hircus* полных референсных митохондриальных геномов, депонированных в публично доступную базу данных GenBank (Национальный центр биотехнологической информации, США) под номерами NC_006853.1 и NC_005044.2 соответственно.

Дизайн олигонуклеотидов осуществлялся с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST [217]. Праймеры подбирались с таким расчётом, чтобы амплифицировать фрагменты длиной не более 120-150 пар нуклеотидов. Такая длина продуктов обеспечивает эффективность ПЦР, близкую к максимальной, и повышает вероятность успешного протекания ПЦР с использованием сильно деградированных матриц.

Из полученных 10 пар праймеров и соответствующих им зондов на основе анализа термодинамических параметров и вероятности образования вторичных структур с использованием пакета ПО Vector NTI 11.5 для дальнейшей работы были отобраны праймеры D_CH (прямой и обратный), 16_BT (прямой и обратный) и vko_P (прямой и обратный) для амплификации участков D-петли домашней козы, 16S рРНК домашнего быка и *Plac* вектора рAL2-T соответственно, а также соответствующие им зонды.

Специфичность праймеров *in silico* проверялась с использованием платформы UCSC Genome Browser [140]. Было показано отсутствие амплификации фрагментов других видов сельскохозяйственных животных, а также неспецифических продуктов реакции при использовании геномов целевых видов. Схемы взаимного расположения разработанных праймеров и зондов приведены на рисунке 3.7.

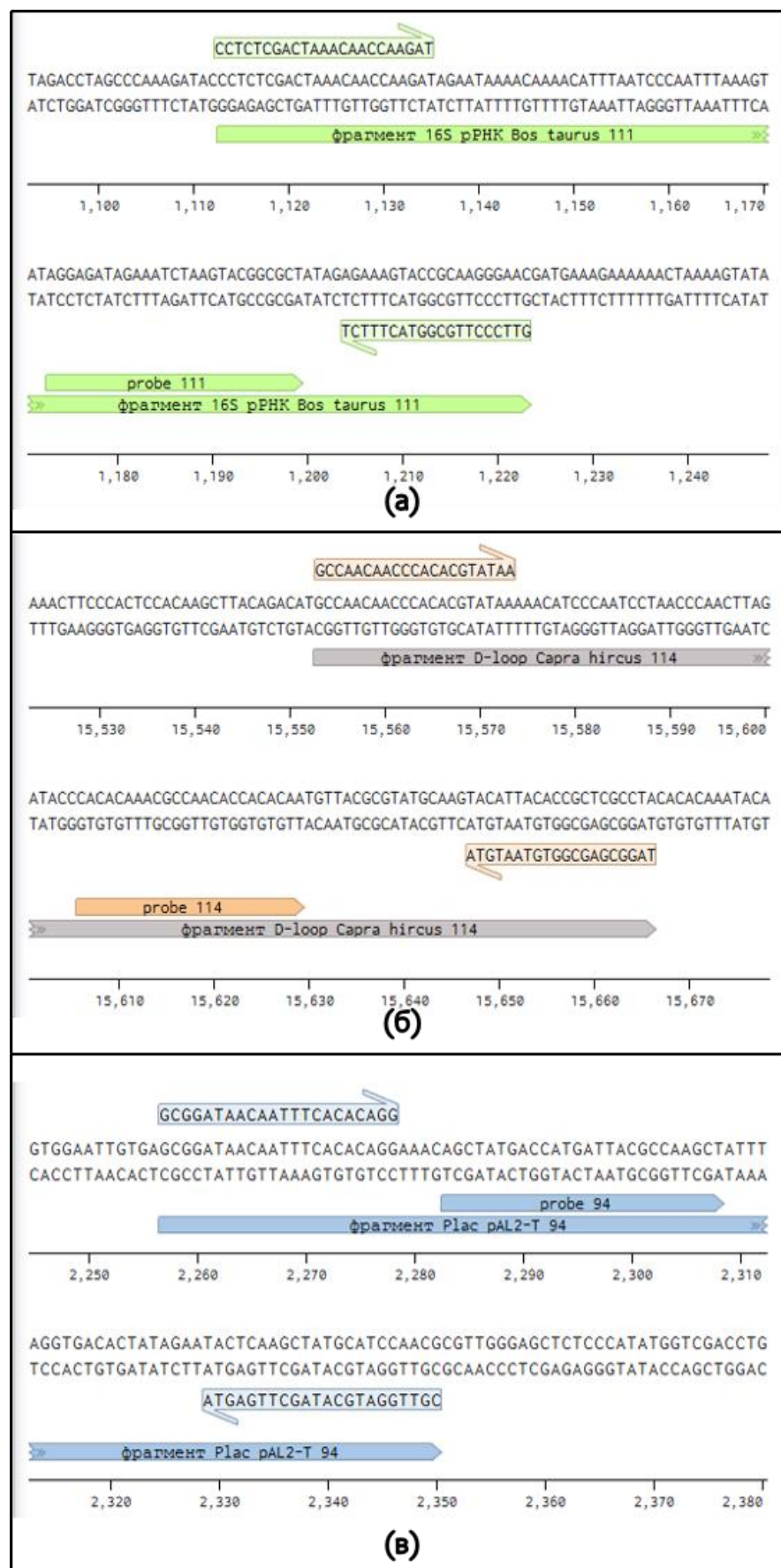


Рисунок 3.7 – Локализация праймеров и зондов для амплификации участка ДНК 16S рРНК коровы (а), D-петли домашней козы (б) и *Plac* pAL2-T (в)

Оценка эффективности олигонуклеотидных праймеров и зондов технологии TaqMan

Ключевым параметром ПЦР в режиме реального времени является эффективность реакции амплификации, демонстрирующая насколько успешно увеличивается число копий целевой ДНК за один цикл реакции. В соответствии с теоретической моделью, предельное значение эффективности при идеальных условиях составляет 2, что эквивалентно 100% эффективности реакции амплификации.

Данный параметр коррелирует с угловым коэффициентом (slope) калибровочной стандартной кривой, значение которого при идеальных условиях равно $-3,32$. Динамический диапазон концентрации ДНК, определяется как диапазон концентраций ДНК-матрицы, в пределах которого соблюдается линейная зависимость реакции амплификации.

Эффективность ПЦР-РВ определяли с использованием метода последовательных разбавлений образца и разработанных видоспецифических праймеров и зондов. По полученным значениям пороговых циклов (C_t) строили калибровочную прямую в координатах $\log[N]/C_t$, где N – количество суммарной ДНК на реакцию. Следует отметить, что полученные результаты не всегда лежат на прямой, поскольку эффективность ПЦР для разных разбавлений может различаться.

Динамический диапазон составлял от 10 нг до 0,001 нг суммарной ДНК на реакцию. Для каждой концентрации ДНК анализировали 8 повторных ПЦР-РВ реакций. В результате было установлено, что амплификация фрагмента 16S рРНК *Bos taurus* при использовании описанного выше набора олигонуклеотидов (16_BT_for + 16_BT_rev + 16_BT_probe) наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,001 нг/мкл ДНК (рисунок 3.8).

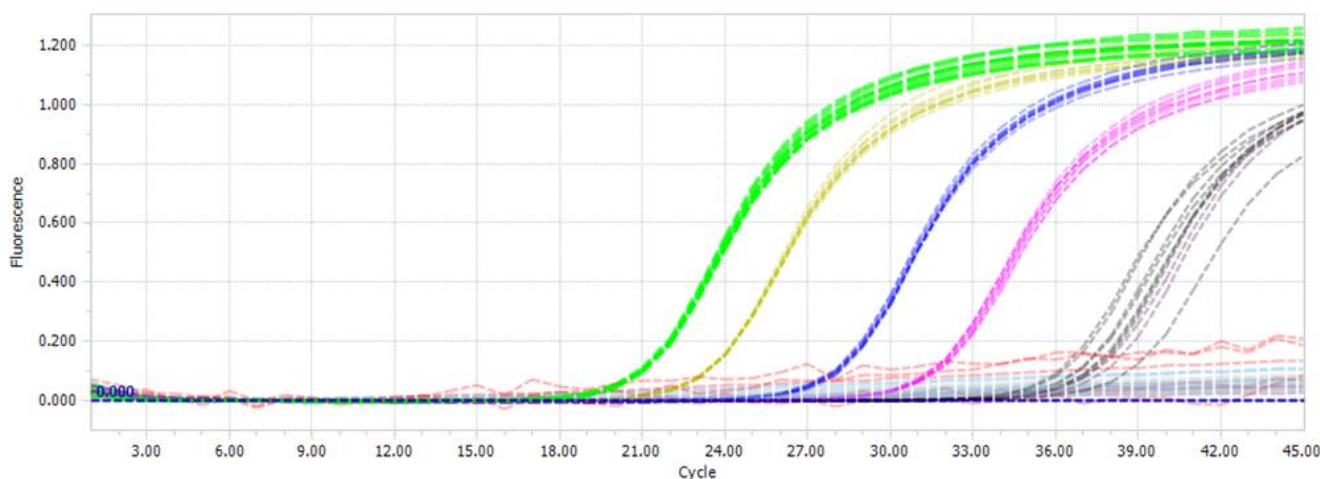


Рисунок 3.8 – Графики кривых амплификации суммарной ДНК *B. taurus*

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины порогового цикла от $\log[N]$ и было возможно количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 3.9).

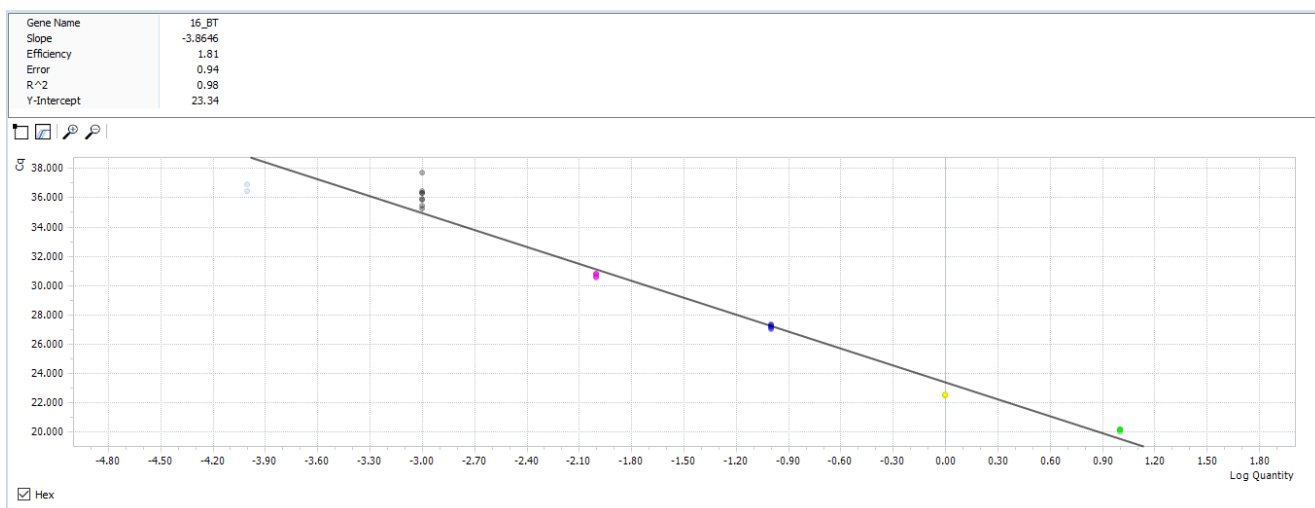


Рисунок 3.9 – График стандартной кривой при амплификации суммарной ДНК *B. taurus*

Анализ графика зависимости порогового цикла от исходной концентрации матрицы, полученного в ходе амплификации последовательных десятикратных разбавлений образца суммарной ДНК коровы, позволил установить основные характеристики ПЦР-РВ. Эффективность ПЦР-РВ с использованием в качестве мишени суммарной клеточной ДНК составила 1,81. Угловый коэффициент прямой был равен -3,8646. Коэффициент корреляции составил 0,98.

Аналогичные эксперименты были проведены в отношении набора олигонуклеотидов (D_CH_for + D_CH_rev + D_CH_probe). В результате

установлено, что амплификация фрагмента D-петли мтДНК *Capra hircus* при использовании соответствующего набора праймеров и зонда наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,0001 нг ДНК (рисунок 3.10).

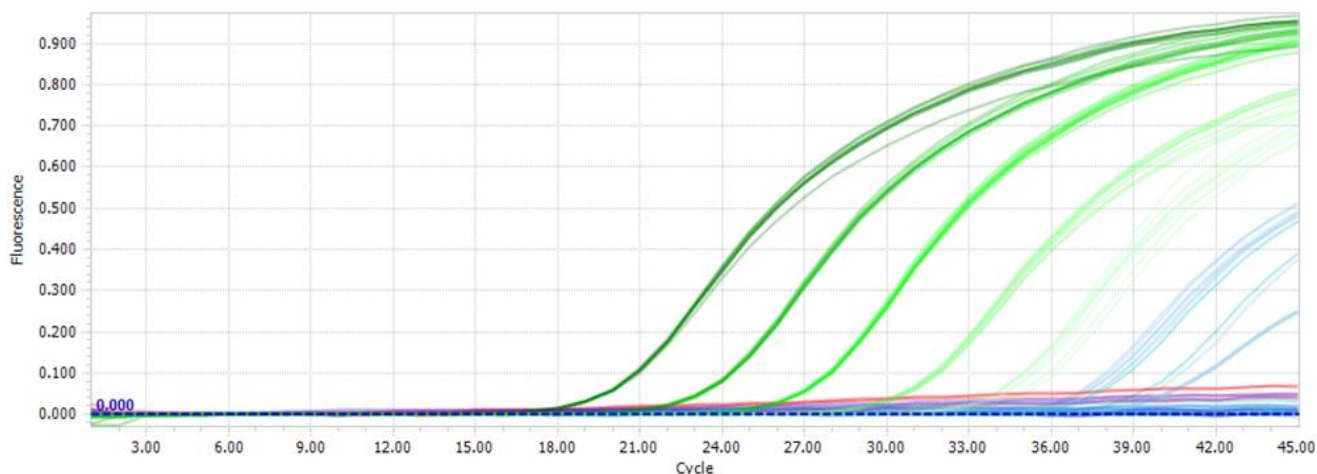


Рисунок 3.10 – Графики кривых амплификации суммарной ДНК *C. hircus*

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины порогового цикла от $\log[N]$, что делает возможным количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 3.11).

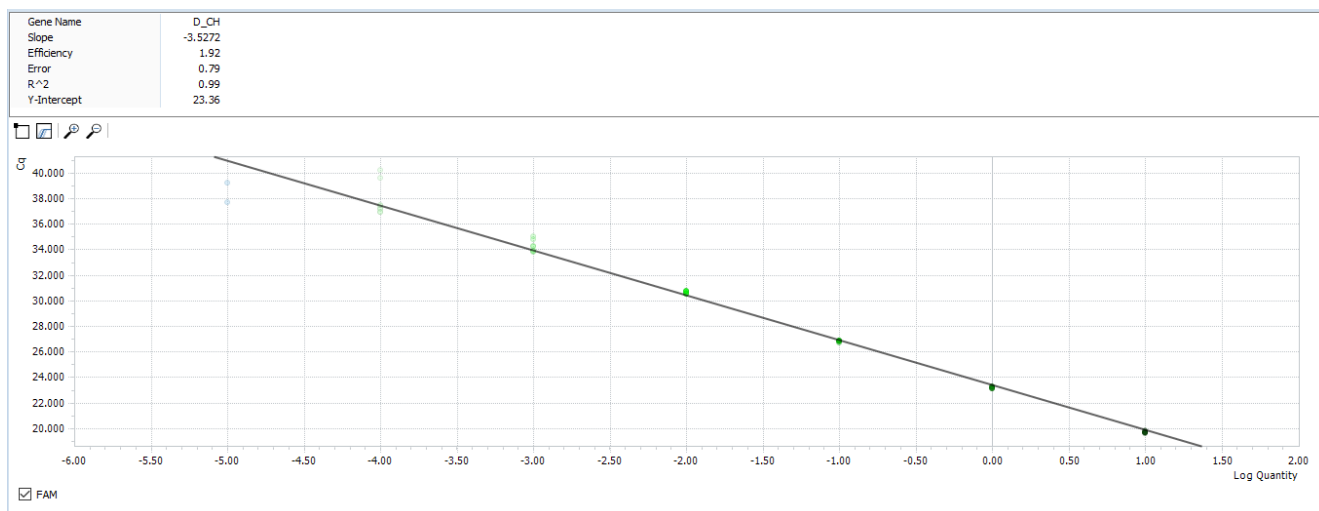


Рисунок 3.11 – График стандартной кривой при амплификации суммарной ДНК *C. hircus*

Анализ графиков зависимости значений пороговых циклов от исходного количества специфических матриц в реакционной смеси, полученных в ходе амплификации последовательных десятикратных разбавлений образца суммарной ДНК козы, позволил установить основные характеристики ПЦР-РВ. Эффективность ПЦР-РВ с использованием в качестве мишени суммарной ДНК

козы составила 1,92. Угловой коэффициент прямой был равен -3,5272. Коэффициент корреляции составил 0,99 [68].

В результате анализа набора олигонуклеотидов (vko_P_for + vko_P_rev + vko_P_probe) установлено, что амплификация фрагмента *Plac* вектора pAL2-T наблюдалась в динамическом диапазоне от 10 нг до 0,000001 нг ДНК (рисунок 3.12).

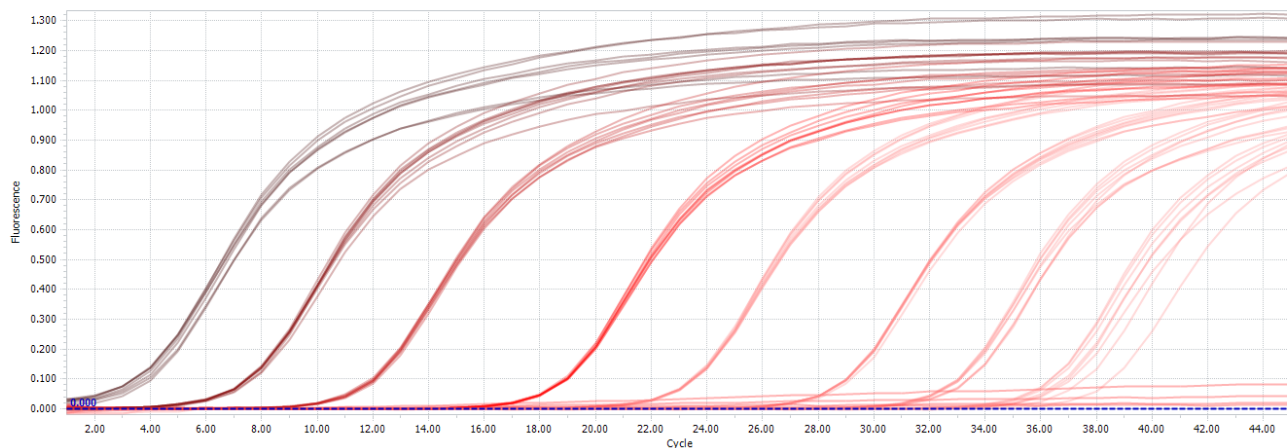


Рисунок 3.12 – Графики кривых амплификации ДНК вектора pAL2-T

В этих пределах сохранялась линейность зависимости величины порогового цикла от $\log[N]$, что делает возможным количественное определение содержания молекулы-мишени в исследуемых образцах (рисунок 3.13).

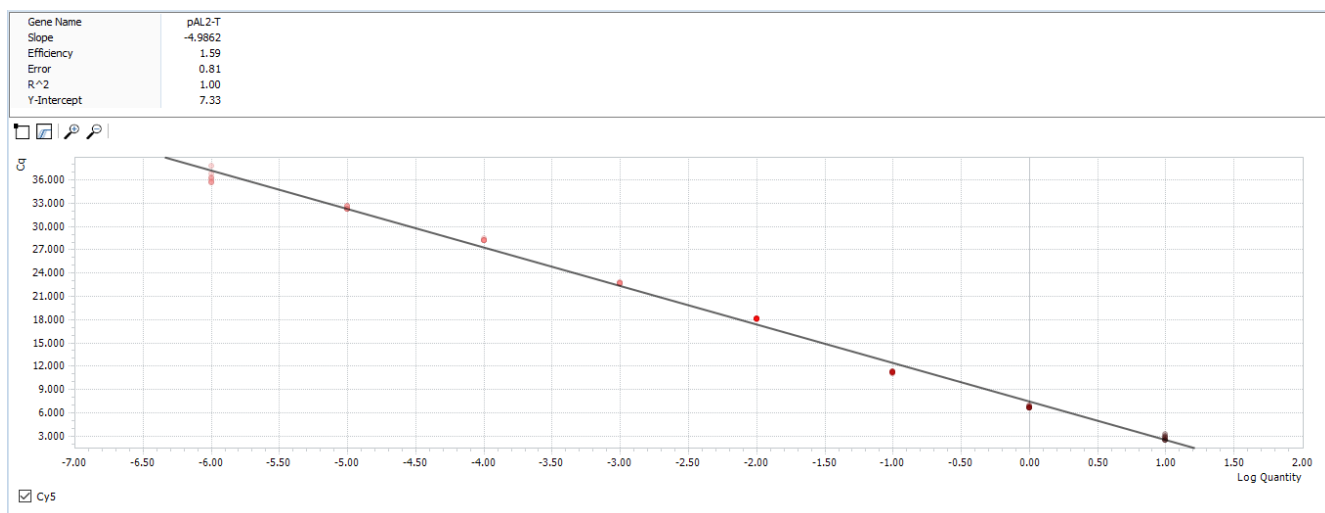


Рисунок 3.13 – График стандартной кривой при амплификации ДНК вектора pAL2-T

Анализ графиков зависимости значений пороговых циклов от исходного количества специфических матриц в реакционной смеси, полученных в ходе

амплификации последовательных десятикратных разбавлений образца суммарной ДНК козы, позволил установить основные характеристики ПЦР-РВ. Эффективность ПЦР-РВ с использованием в качестве мишени суммарной ДНК составила 1,59. Угловой коэффициент прямой был равен -4,9862. Коэффициент корреляции составил 0,81.

Таким образом, в рамках исследования был разработан дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, обеспечивающих одновременную амплификацию участков ДНК коровы, козы и ВКО. Разработанная панель олигонуклеотидов обладает высокой эффективностью, что делает их пригодными для использования в мультиплексной ПЦР-РВ в диагностике *in vitro*, контроле качества молочной продукции, а также в других областях молекулярной биологии и генетики.

3.3 Молекулярно-генетический анализ лабораторных молочных матриц методами ПЦР

Анализ молочных матриц с использованием симплексной и мультиплексной ПЦР

На первом этапе была изучена пригодность пары праймеров ВТ-Ф и ВТ-Р [105] для обнаружения целевой последовательности рибосомальной 16S РНК генома *Bos taurus* методом симплексной ПЦР в смоделированных в условиях лаборатории модельных смесях козьего и коровьего молока, имитировавших различный уровень фальсификации молока-сырья. Аналогично, но уже с использованием пары специфических праймеров СН-Ф и СН-Р [105], комплиментарных последовательностям генома *Capra hircus*, выявляли присутствие козьей ДНК в вышеописанных бинарных молочных смесях.

Доля примеси коровьего молока варьировала от 1% до 99% в исследуемых молочных матрицах. В ходе анализа электрофореграмм было установлено, что праймеры ВТ-Ф и ВТ-Р позволяют эффективно выявлять добавление коровьего молока в козьем начиная с 1% как в сыром (рисунок 3.14), так и в пастеризованном молоке.



Рисунок 3.14 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы (А) и D-петли козы (Б) при симплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей сырого молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «K-» – отрицательный контроль; «K+» – ДНК козы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

При этом во всех исследуемых образцах с коровьей ДНК наблюдался ампликон с теоретически ожидаемым размером – 583 п.н [69]. Кроме того, также было определено, что симплексный ПЦР-анализ с праймерами CH-F и CH-R высокочувствителен в отношении ДНК козы, и способен определять наличие козьего молока ($\geq 1\%$) в различных бинарных молочных смесях, поскольку во всех пробах с наличием козьей ДНК наблюдался ПЦР-продукт видоспецифической амплификации размером 184 п.н. (рисунок 3.15).



Рисунок 3.15 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы (А) и D-петли козы (Б) при симплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей пастеризованного молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – отрицательный контроль; «К1+» – ДНК коровы; «К2+» – ДНК козы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Аналогичные результаты были получены при использовании симплексной ПЦР для выявления содержания коровьего молока в образцах кисломолочных продуктов, приготовленных из бинарных смесей пастеризованного молока двух видов животных на йогуртовой закваске. Предел обнаружения ДНК коровы составил 1% (рисунок 3.16).



Рисунок 3.16 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы (А) и D-петли козы (Б) при симплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске, полученных из смесей молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – отрицательный контроль; «К1+» – ДНК коровы; «К2+» – ДНК козы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Однако при попытке амплификации фрагмента гена 16S рРНК *Bos taurus* длиной 583 пар нуклеотидов на матрице клеточной ДНК, выделенной из стерилизованного молока, амплифицированные продукты не наблюдались ни в одном из рассмотренных случаев. Вероятно, данный факт связан с сильным повреждением молекул ДНК в процессе стерилизации сырого молока (3 мин при температуре 121 °С), приводящей к образованию фрагментов с длиной, недостаточной для синтеза ампликонов требуемой протяжённости. Тем не менее, амплифицированные фрагменты генов козьей ДНК были получены и визуально

детектированы, что подтверждает возможность выявления продуктов ПЦР меньшей длины (рисунок 3.17).



Рисунок 3.17 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы (А) и D-петли козы (Б) при симплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей стерилизованного молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – отрицательный контроль; «К1+» – ДНК коровы; «К2+» – ДНК козы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Следующим этапом было проведение мультиплексной ПЦР с одновременным использованием двух пар праймеров (BT-F + BT-R и CH-F + CH-R). ПЦР-продукт размером 583 п.н. отсутствовал при использовании образцов смесей с минимальным внесением коровьего молока. Однако количество амплифицированных продуктов с коровьего генома увеличивалось в ряду анализа проб повышения содержания целевой матрицы ДНК *Bos taurus*, что в конечном

счете проявилось в виде фрагментов теоретически ожидаемой длины, начиная с образца 9, соответствующего 50% примеси коровьего молока (рисунок 3.18).



Рисунок 3.18 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы и D-петли козы при мультиплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей сырого молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «K-» – отрицательный контроль; «K1+» – ДНК козы; «K2+» – ДНК коровы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Относительный предел чувствительности дуплексного ПЦР-анализа смесей пастеризованного молока составил 10% объёмной примеси коровьего молока, что ниже, чем при симплексной ПЦР (рисунок 3.19).

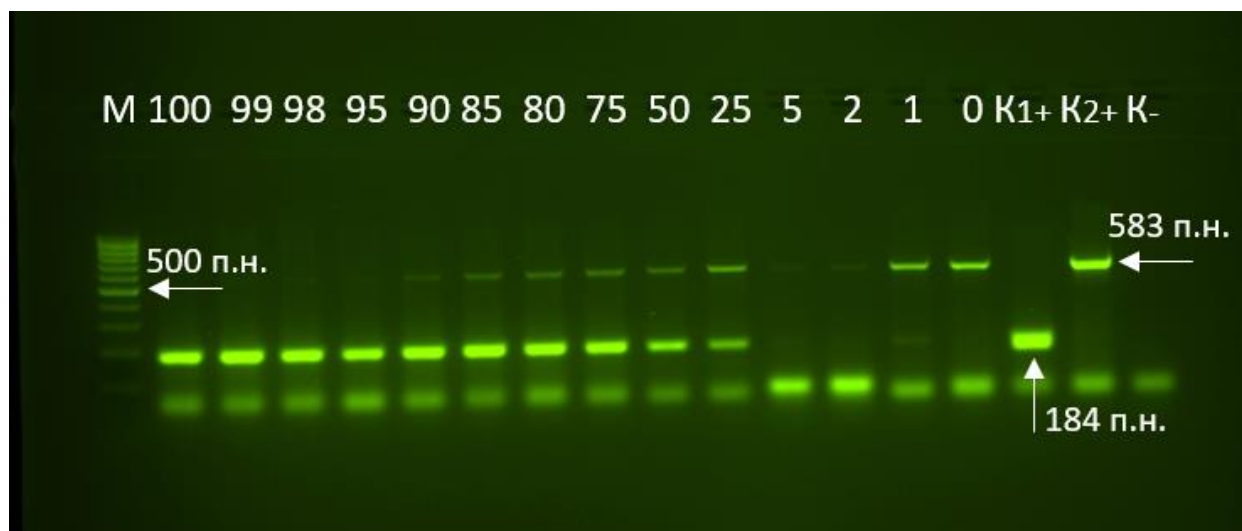


Рисунок 3.19 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы и D-петли козы при мультиплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей пастеризованного молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «K-» – отрицательный контроль; «K1+» – ДНК козы; «K2+» – ДНК коровы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Напротив, ампликоны, полученные с мтДНК козы, были визуально различимы и присутствовали в образцах №1-№10 на электрофореграммах всех исследованных бинарных матриц, что указывает на высокую чувствительность дуплексной ПЦР при амплификации козьей ДНК, нижний предел которой составил 5% для стерилизованного молока и 1% - для остальных продуктов.

По сравнению с симплексной ПЦР с применением одной пары праймеров мультиплексная ПЦР демонстрировала более низкую чувствительность и в случае кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске, приготовленных с использованием смесей козьего и коровьего молока. Предел обнаружения примеси коровьего молока составил 10% (рисунок 3.20).

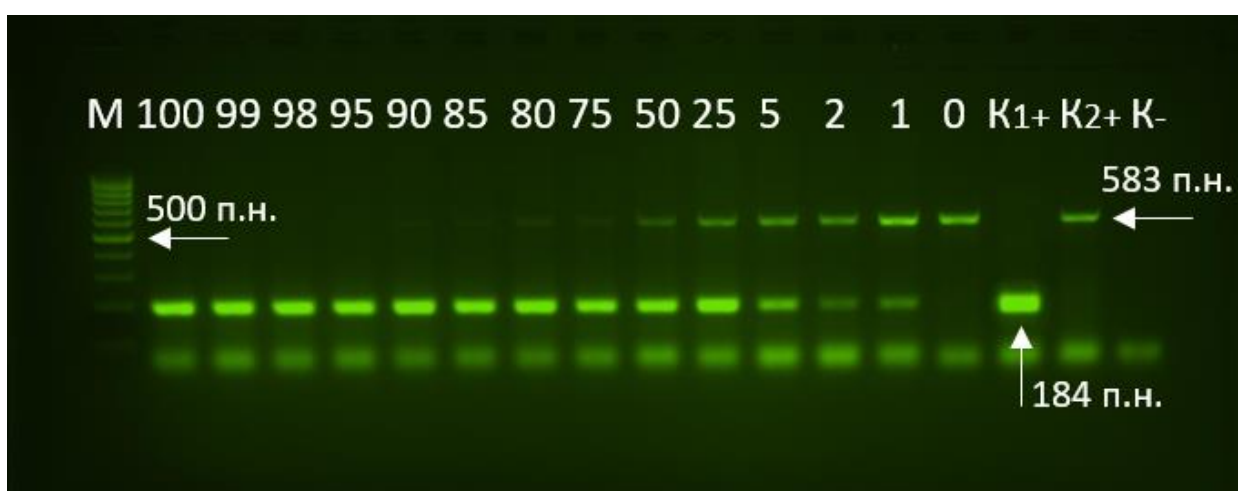


Рисунок 3.20 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы и D-петли козы при мультиплексной ПЦР; 100-0% – образцы ДНК, выделенной из кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске, полученных из смесей молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «K-» – отрицательный контроль; «K1+» – ДНК козы; «K2+» – ДНК коровы; M – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

При проведении мультиплексной ПЦР при анализе проб ДНК, выделенной из смесей стерилизованного козьего и коровьего молока предполагалось, что чувствительность обнаружения козьей ДНК останется на уровне 1%, как и в случае постановки симплексной ПЦР. Однако чувствительность оказалась ниже и составила 5%. Снижение чувствительности может быть связано с тем, что наличие четырёх праймеров в реакционной смеси негативно влияет на эффективность ПЦР. При этом результаты мультиплексной ПЦР также показали отсутствие

целевого ампликона, соответствующего продукту амплификации коровьей ДНК (рисунок 3.21).



Рисунок 3.21 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов 16S рРНК коровы и D-петли козы при мультиплексной ПЦР; 100-0% – образцы с ДНК, выделенной из смесей стерилизованного молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – отрицательный контроль; «К1+» – ДНК козы; «К2+» – ДНК коровы; М – маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Результаты исследования подтверждают эффективность использования ПЦР-анализа для видовой идентификации молочной продукции. Тем не менее, для обнаружения незначительных примесей молока другого вида в продуктах высокой температурной обработки требуется оптимизация методики и разработка олигонуклеотидов, направленных на амплификацию более коротких фрагментов ДНК.

Анализ молочных матриц с использованием прямой ПЦР

Метод прямой ПЦР позволяет исключить трудоёмкий и продолжительный этап выделения ДНК, что приводит к значительному сокращению временных и экономических затрат на проведение анализа. В ходе исследования применения прямой ПЦР для оценки подлинности козьего молока были анализированы модельные смеси козьего и коровьего молока с объёмной долей примеси коровьего молока от 0 до 100%. Результаты симплексной прямой ПЦР с олигонуклеотидными праймерами ВТ-F и ВТ-R, СН-F и СН-R показали, что пределы обнаружения выявления сырого коровьего и козьего молока составляли 1% [63].

Кроме того, результаты чувствительности мультиплексной прямой ПЦР с двумя вышеописанными парами праймеров были также сопоставимы с симплексной прямой ПЦР (рисунок 3.22).

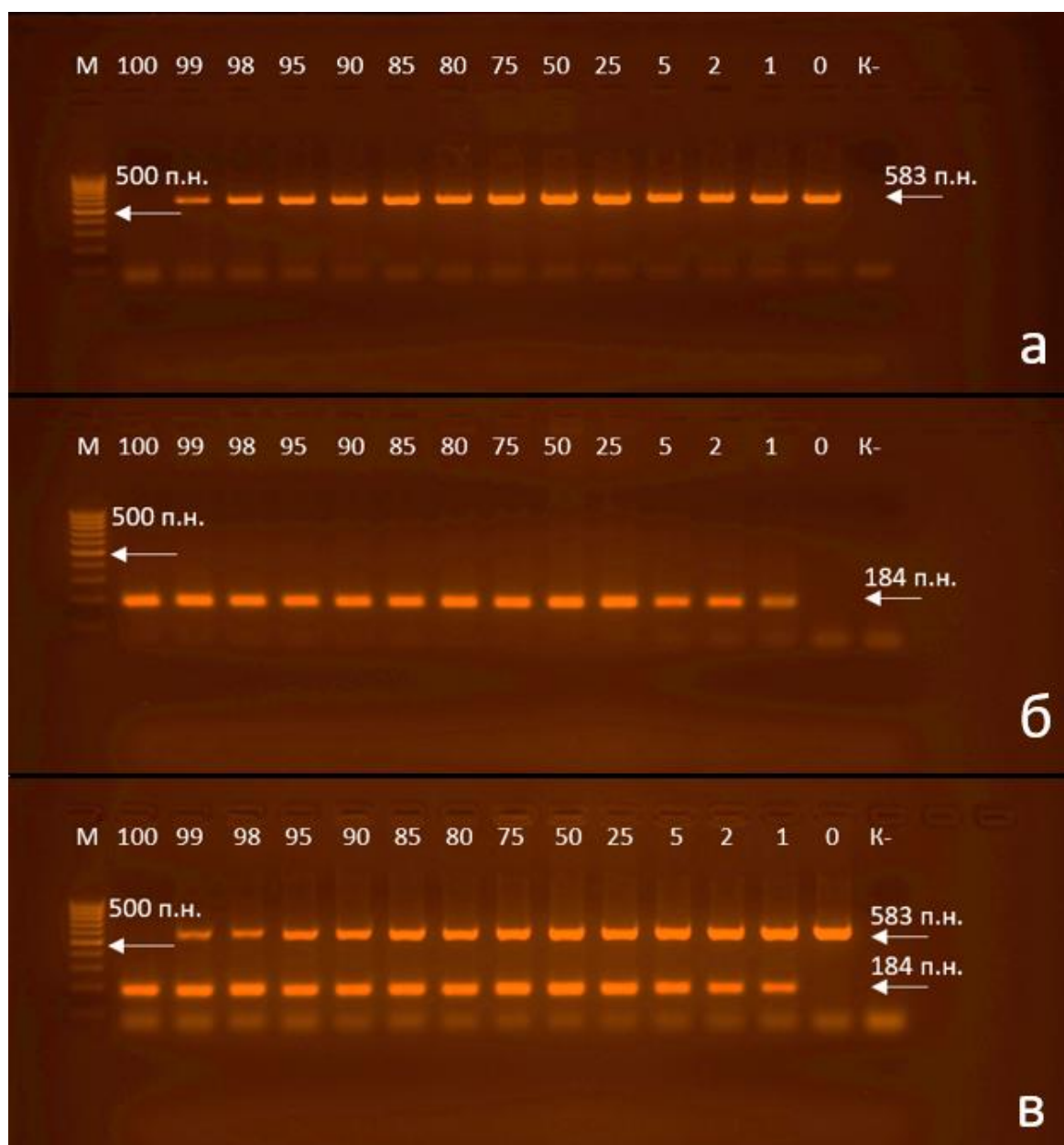


Рисунок 3.22 – Электрофореграмма типовых результатов прямой симплексной ПЦР фрагментов 16S рРНК коровы (а), D-петли козы (б); прямой мультиплексной ПЦР (в); 100-0% – образцы смесей сырого молока с соответствующей объемной долей козьего молока; «К-» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Установлено, что метод прямой ПЦР позволяет проводить идентификацию состава молока-сырья и упрощает проведение молекулярно-генетического анализа, в связи с отсутствием предварительных этапов пробоподготовки биоматериала (лизис, очистка, экстракция ДНК и др).

Определение чувствительности выявления ССК коровы относительно ССК козы в молоке методом ПЦР-РВ с SYBR Green

После определения содержания ССК в сыром коровьем и козьем молоке, каждый вид молока был нормализован по числу соматических клеток до 100 тыс./мм³ с помощью раствора NaCl. После нормализованные по числу ССК смеси молока были смешаны в следующих пропорциях: 100%, 99,9%, 99%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0% коровьего молока. В результате оценки 8 результатов отдельных испытаний методом ПЦР-РВ с праймерами ВТ-Ф + ВТ-Р и флуоресцентным красителем SYBR Green 10 различных массовых концентраций ДНК коровы относительно ДНК домашней козы, строили графики кривых амплификации определения ССК *B. taurus* в смесях коровьего и козьего молока (рисунок 3.23).

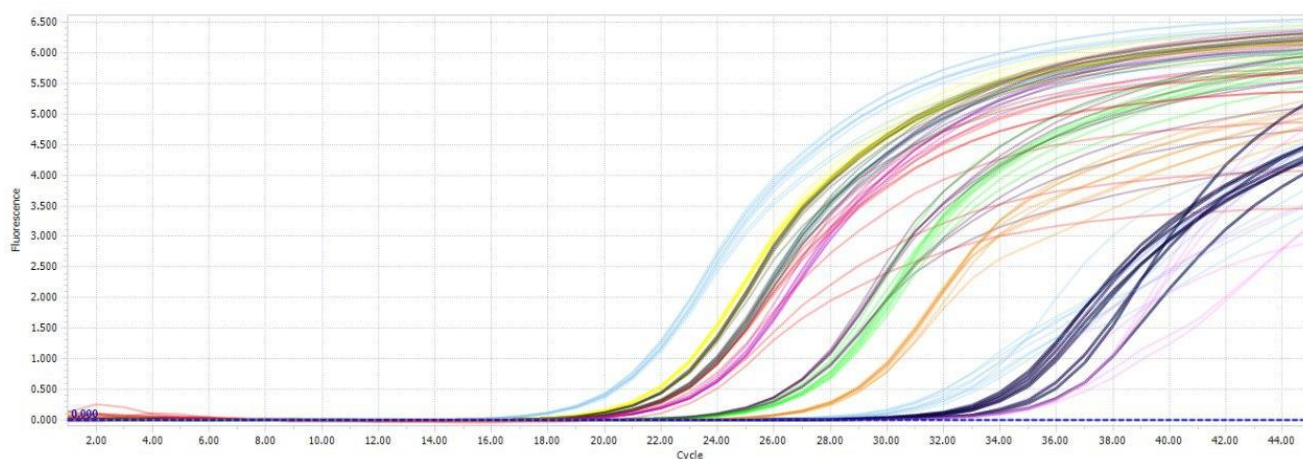


Рисунок 3.23 – График зависимости значений C_t от ССК *Bos taurus*, определяемого по росту флуоресцентного сигнала, при амплификации фрагмента гена 16S рРНК в смесях молока

На основании полученных данных значений C_t строили график стандартной кривой (рисунок 3.24).

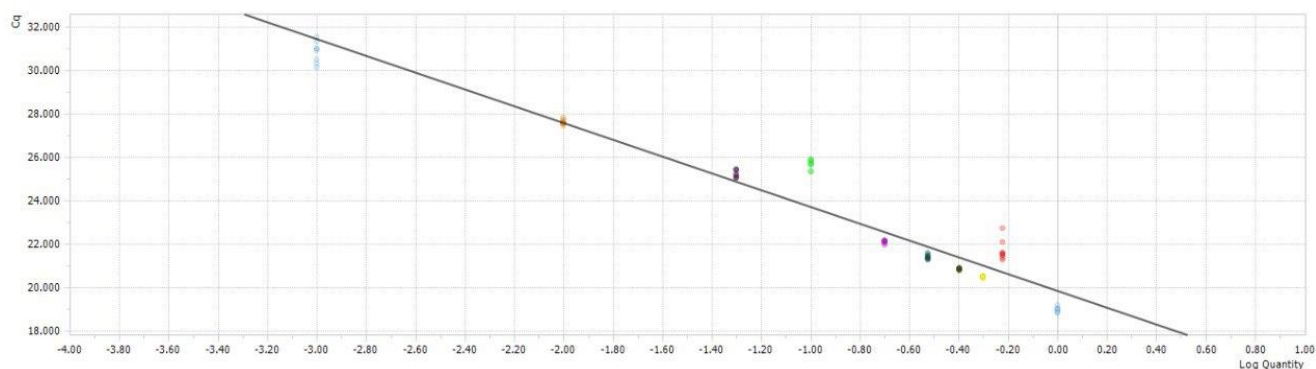


Рисунок 3.24 – Стандартная кривая определения Ct от ССК *B. taurus* ($\log[N]$) при амплификации фрагмента гена 16S рРНК в смесях молока

Значения пороговых циклов (Ct) и SD (Ct) для каждой массовой концентрации суммарной ДНК приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Значения Ct, SD при разных массовых концентрациях суммарной клеточной ДНК *B. taurus*

Количество соматических клеток коровы на мл	Ct, циклов	SD, циклов
100	30,84	0,49
1000	27,62	0,12
5000	25,24	0,16
10000	25,68	0,23
20000	22,09	0,08
30000	21,41	0,1
40000	20,84	0,04
50000	20,47	0,04
60000	21,7	0,48
100000	18,97	0,11

Анализ результатов амплификации методом ПЦР-РВ полученных ампликонов проводили с использованием электрофореза в 2%-агарозном геле (рисунок 3.25).

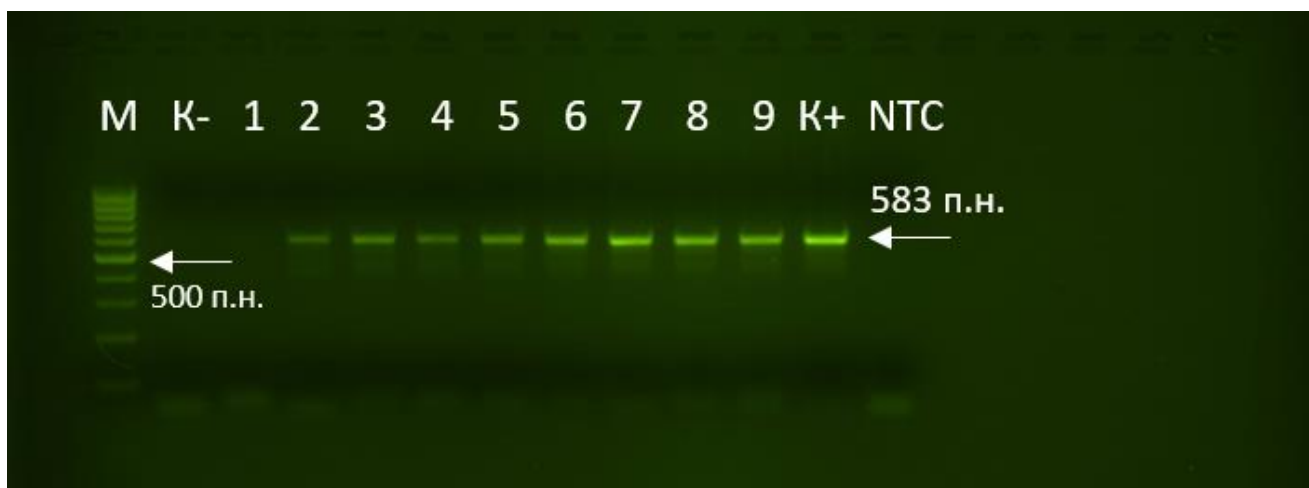


Рисунок 3.25 – Электрофореграмма типовых результатов чувствительности праймеров ВТ-Ф и ВТ-Р; №1-№9 - образцы с ДНК, выделенной из смесей козьего и коровьего молока с различным содержанием соматических клеток коровы: 0,1 тыс., 1 тыс., 5 тыс., 10 тыс., 20 тыс., 30 тыс., 40 тыс., 50 тыс., 60 тыс.; «К-» – (ДНК из козьего молока); «К+» – (ДНК из коровьего молока); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

В результате экспериментальных исследований установлено, что методом ПЦР-РВ с SYBR Green и праймерами ВТ-Ф и ВТ-Р можно выявить 1% ССК коровы в сыром козьем молоке.

3.4 Разработка молекулярно-генетического метода на основе мультиплексной ПЦР-РВ

Определение метрологических характеристик метода одновременной амплификации мтДНК *Bos taurus* и *Capra hircus*

Определение ряда ключевых метрологических характеристик метода одновременной амплификации мтДНК *Bos taurus* и *Capra hircus*, используемого для выявления фальсификации козьего молока и полученных из него продуктов переработки, осуществляли с использованием положений ГОСТ Р 70150-2022 [18] и ГОСТ Р 8.1039-2024 [20]. Значение абсолютного предела обнаружения (LODabs) определяли, анализируя не менее 60 повторов ПЦР-РВ с олигонуклеотидами 16_BT_for, 16_BT_rev, 16_BT_probe для каждой измеряемой концентрации ДНК. Результаты измерений абсолютного предела обнаружения ДНК *Bos taurus* приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Предел обнаружения мтДНК *Bos taurus*

Концентрация ДНК, нг/реакция	Ct, циклов	SD, циклов
1	22,70	0,11
0,001	35,45	1,07
0,0005	37,10	1,10
0,0001	37,37	0,71
ОКО	-	-

Установлено, что абсолютный предел обнаружения составляет 0,0005 нг суммарной клеточной коровьей ДНК на реакцию, при котором все 60 повторов положительны (согласно ГОСТ Р 8.1039—2024 [20]). Результаты визуализации определения LODabs приведены на рисунке 3.26.

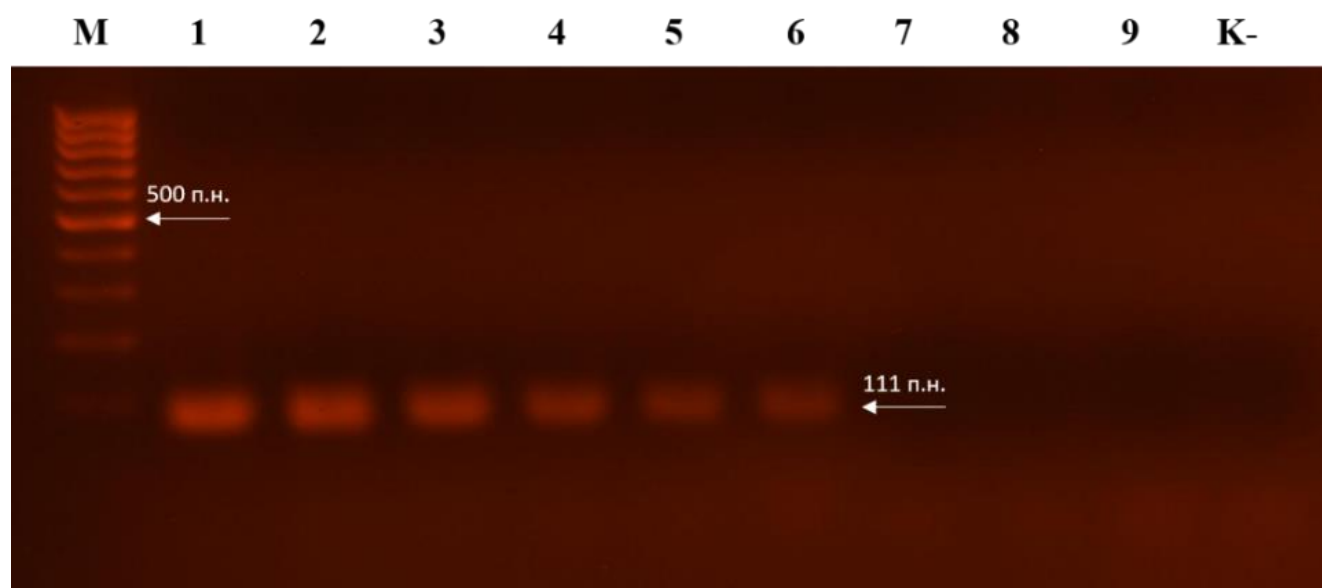


Рисунок 3.26 – Электрофореграмма типовых результатов определения абсолютного LOD коровьей ДНК (1 – 10 нг ДНК; 2 – 1 нг ДНК; 3- 0,1 нг ДНК; 4 – 0,01 нг ДНК; 5 – 0,001 нг ДНК; 6 – 0,0005 нг ДНК; 7 – 0,0001 нг ДНК; 8 – 0,00001 нг ДНК; 9 – 0,000001 нг ДНК; «К-» – отрицательный контроль; «М» – маркер длин ДНК 100+ bp)

Динамический диапазон амплификации фрагмента гена 16S рРНК при серийных разведениях суммарной клеточной ДНК *Bos taurus* определяли в пределах, охватывающих количество ДНК от 10 до 0,000001 нг суммарной ДНК на реакцию. Для каждой определяемой концентрации ДНК анализировали 16 повторных ПЦР-РВ реакций. Установлено, что линейность зависимости величины

порогового цикла от $\log[N]$ сохранялась до уровня в 0,001 нг суммарной ДНК *B. taurus*.

Определение значения LODabs козьей ДНК проводили аналогично, путём анализа 60 отдельных реакций ПЦР-РВ с олигонуклеотидами D_CH_for, D_CH_rev, D_CH_probe для каждой измеряемой концентрации ДНК *C. hircus*. Результаты измерений приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Предел обнаружения мтДНК *Capra hircus*

Концентрация ДНК, нг/реакция	St, циклов	SD, циклов
1	23,20	0,07
0,001	34,24	0,47
0,0001	37,89	1,28
0,00001	38,48	1,07
ОКО	-	-

В результате было установлено, что абсолютный предел обнаружения ДНК *C. hircus* составляет 0,00001 нг на реакцию, при котором все 60 повторов реакций положительны. Результаты визуализации определения LODabs мтДНК козы приведены на рисунке 3.27.

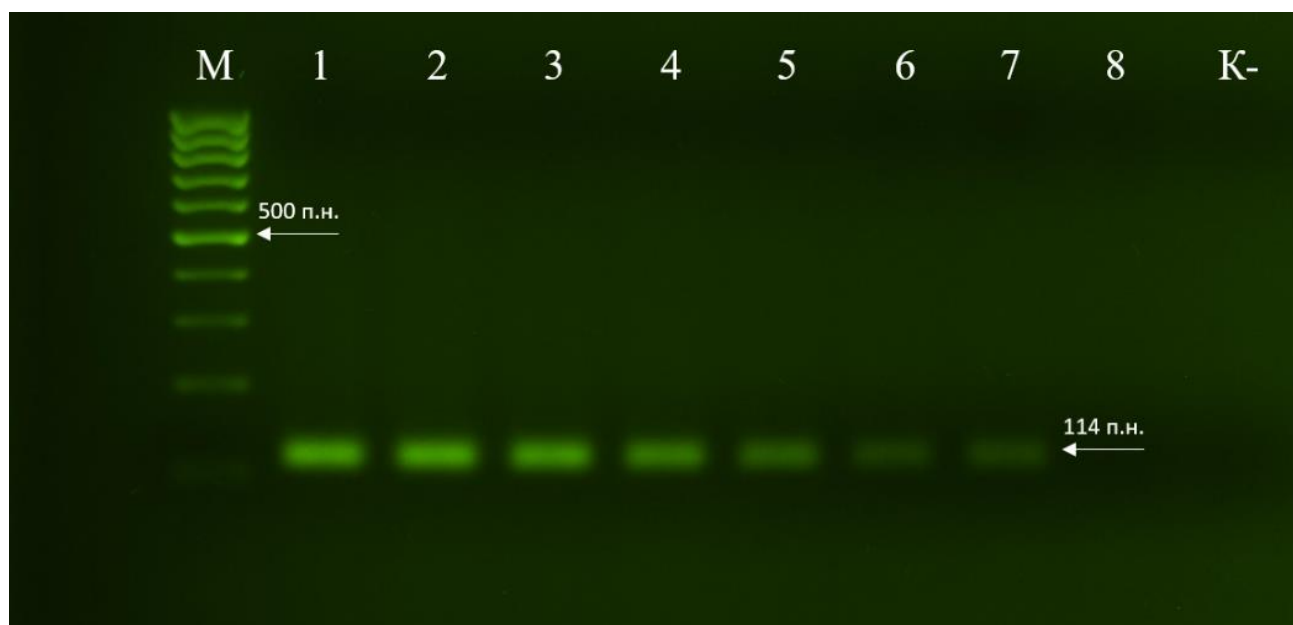


Рисунок 3.27 – Электрофореграмма типовых результатов определения абсолютного LOD козьей ДНК (1 – 10 нг ДНК, 2 – 1 нг ДНК, 3 – 0.1 нг ДНК, 4 – 0.01 нг ДНК, 5 – 0.001 нг ДНК, 6 – 0.0001 нг ДНК, 7 – 0.00001 нг ДНК, 8 – 0.000001 нг ДНК; «К-» – отрицательный контроль, М - маркер длин ДНК 100 bp)

Динамический диапазон амплификации участка D-петли при серийных разведениях суммарной клеточной ДНК *Capra hircus* определяли в пределах, охватывающих количество ДНК от 10 до 0,000001 нг суммарной ДНК на реакцию. Для каждой определяемой концентрации ДНК анализировали 16 повторных ПЦР-РВ реакций. Установлено, что линейность зависимости величины порогового цикла от $\log[N]$ сохранялась до уровня в 0,0001 нг суммарной ДНК *C. hircus*.

Кроме того, при определении предела количественного измерения, выраженного в виде детектируемой массовой доли чужеродной ДНК, оценкой результатов 64 отдельных испытаний 3 различных массовых концентраций коровьей ДНК относительно козьей ДНК установлено, что относительный предел количественного определения (LOQ) составляет не менее 1% в дуплексном режиме. Результаты приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Значения C_t при разных массовых концентрациях суммарной коровьей ДНК в смеси

Массовая концентрация ДНК <i>B. taurus</i> , %	C_t , циклов	SD, циклов
10	25,11	0,34
1	28,71	1,81
0,1	-	-
ПКО-Ch	37,82	1,95
ОКО	-	-

Графики накопления ампликонов при определении LOQ мтДНК *Bos taurus* представлены на рисунке 3.28.

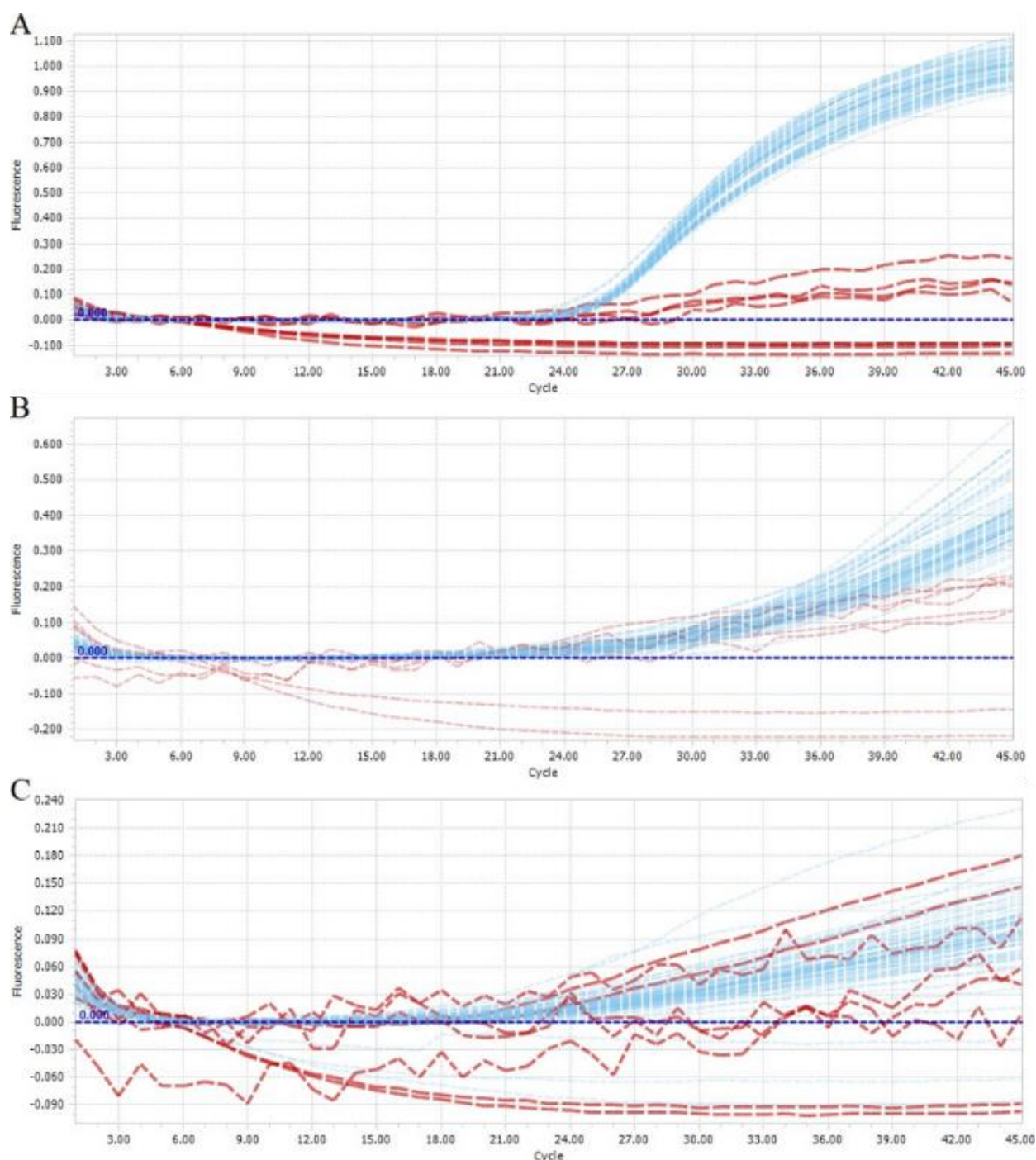


Рисунок 3.28 – Графики накопления ПЦР-продуктов для определения относительного LOQ мтДНК *Bos taurus*; А – массовая доля ДНК *B. taurus* 10%; В – массовая доля ДНК *B. taurus* 1%; С – массовая доля ДНК *B. taurus* 0,1%

Оценка сходимости результатов ПЦР в режиме реального времени проводилась одним оператором с применением одного и того же оборудования в течение одного дня двумя сериями экспериментальных испытаний. При этом оба эксперимента включали амплификацию положительных контрольных образцов (ПКО) в десятикратных разведениях в 10 повторах. Для определения сходимости результатов ПЦР-РВ с применением технологии TaqMan проводили расчет

коэффициента вариации (CV) значений пороговых циклов для ПКО с определенной концентрацией ДНК *Bos taurus* по Формуле 3.1:

$$CV = \frac{\delta}{\bar{x}}, \quad (3.1)$$

где δ – среднеквадратическое отклонение (СКО), \bar{x} – среднее арифметическое результатов пороговых циклов.

Оценка сходимости результатов мультиплексной ПЦР с использованием набора олигонуклеотидов 16_ВТ + D_СН показала, что коэффициент вариации между значениями C_t , полученных для каждой концентрации коровьей ДНК в 10 повторах, одним оператором, на одном приборе, в один день дважды, не превышал 5%, что говорит об их сходимости (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Оценка сходимости результатов амплификации ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ

Концентрация ДНК, нг/мкл	C_t , среднее	C_t , среднеквадратическое отклонение	CV, %
10	18,95	0,11	0,57
1	22,49	0,13	0,57
0,1	26,18	0,35	1,34
0,01	30,89	1,53	4,96
0,001	34,13	1,52	4,46

Оценка воспроизводимости результатов мультиплексной ПЦР-РВ проводилась двумя операторами с применением различного оборудования в разные дни двумя сериями экспериментальных испытаний. Определение воспроизводимости значений пороговых циклов при амплификации фрагмента мтДНК домашнего быка при использовании набора праймеров и зондов 16_ВТ + D_СН и количества ДНК, находящегося ближе к нижней границе линейного диапазона (0,01 нг ДНК на реакцию), выполненное двумя операторами на двух различных приборах (Light Cycler96 и Rotor-Gene Q), показало, что CV значений пороговых циклов не превышал 10%, что говорит об их воспроизводимости (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Оценка воспроизводимости результатов амплификации ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ

Оператор I, C _t		Оператор II, C _t		C _t среднее	C _t , СКО	CV, %
31,53	30,92	32,29	32,3	32,01	1,07	3,34
31,07	30,89	32,5	33,15			
31,22	30,90	33,07	33,21			
31,25	30,59	32,35	31,88			
31,32	31,23	32,97	32,2			
33,17	31,33	33,17	32,44			
31,24	31,28	31,89	32,64			
30,89	31,31	32,12	33,08			
31,66	31,20	32,62	32,31			
31,54	31,48	31,99	32,27			
31,13	31,20	32,73	32,4			
30,85	31,33	32,14	33,09			
31,24	31,22	32,23	33,20			
30,79	30,02	32,3	32,33			
30,90	31,52	32,78	33,76			
31,10	30,86	31,73	32,29			
31,67	31,53	32,54	31,85			
31,12	31,10	32,74	32,88			
31,35	31,10	33,02	33,4			
30,72	31,79	31,66	33,06			
31,17	31,53	32,82	32,8			
30,45	31,39	33,2	35,33			
30,71	31,71	34,03	33,56			
31,27	31,14	37,32	32,55			
30,92	31,21	32,81	33,47			
31,03	31,41	32,09	32,77			
30,78	31,83	33,35	32,8			
30,51	31,29	32,38	32,03			
31,55	30,88	33,69	33,32			
30,87	31,24	33,51	33,72			

Для оценки стабильности набора реагентов при одновременной амплификации фрагментов мтДНК домашнего быка и козы были проведены многократные циклы замораживания-оттаивания. Протокол циклов замораживания-оттаивания предусматривал последовательное проведение этапа оттаивания при комнатной температуре (30 мин) с последующим этапом замораживания при температуре -20°C (60 мин).

Стабильность компонентов тест-системы оценивалась на основе анализа CV значений пороговых циклов (C_t) ПКО, используемых для построения стандартной

калибровочной кривой. Оценка проводилась после проведения мультиплексной ПЦР-РВ с использованием реагентов, прошедших соответствующее количество циклов замораживания-оттаивания (рисунки 3.29-3.34).

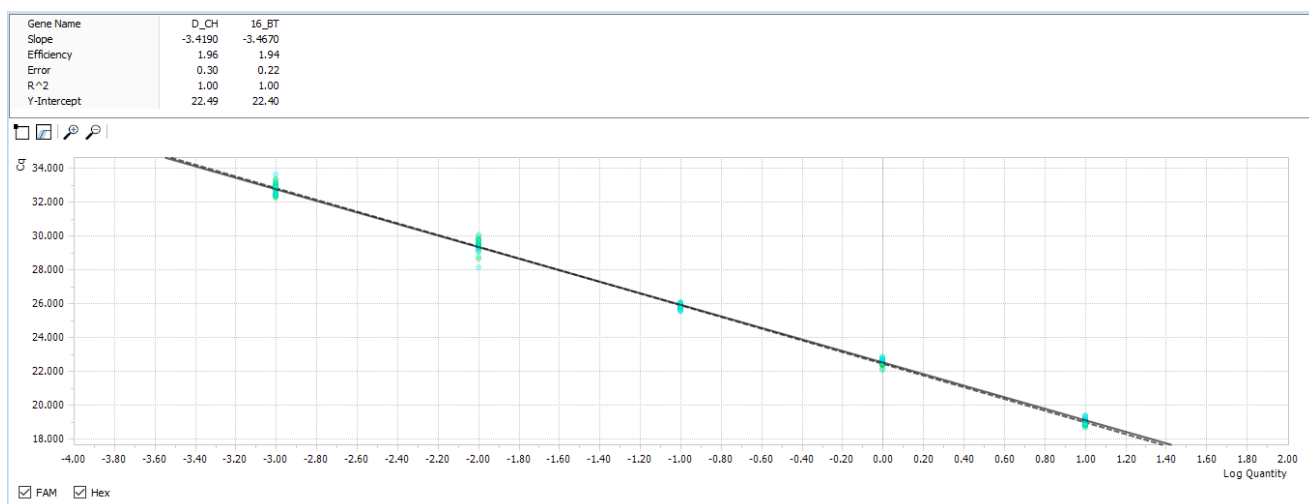


Рисунок 3.29 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 1 цикла замораживания-оттаивания

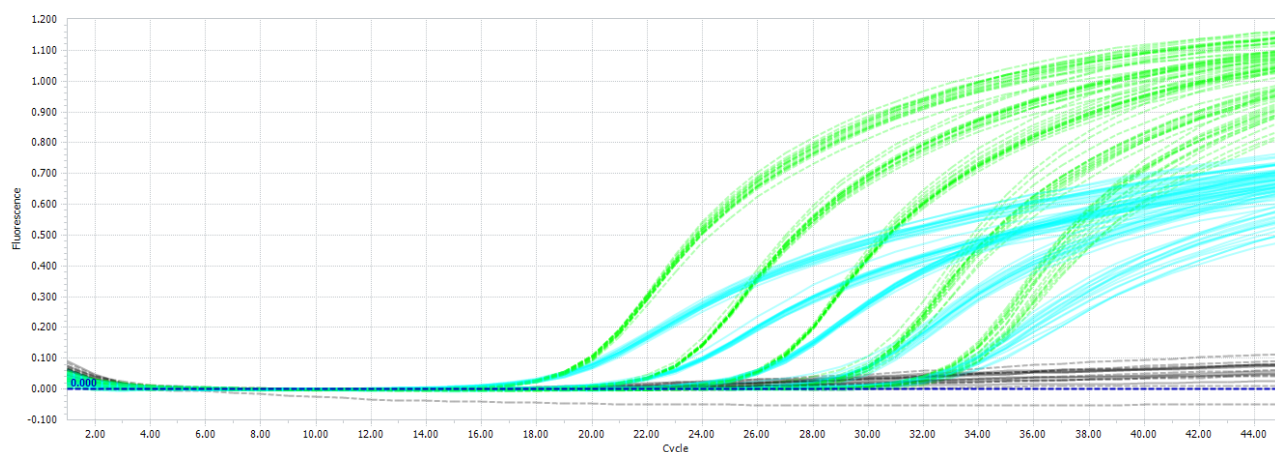


Рисунок 3.30 – Графики кривых амплификации при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 1 цикла замораживания-оттаивания

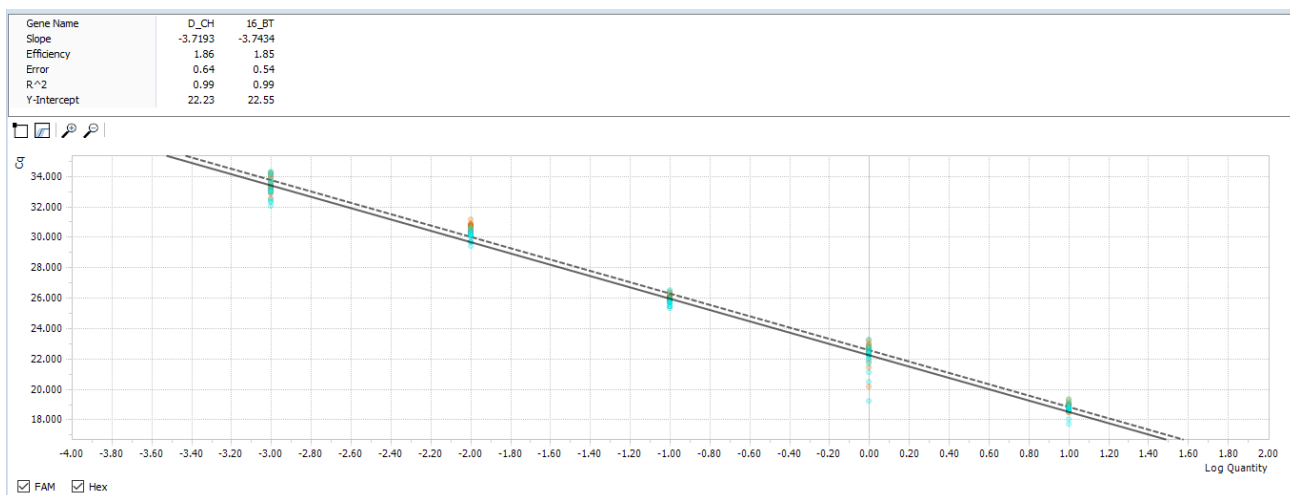


Рисунок 3.31 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 5 цикла замораживания-оттаивания

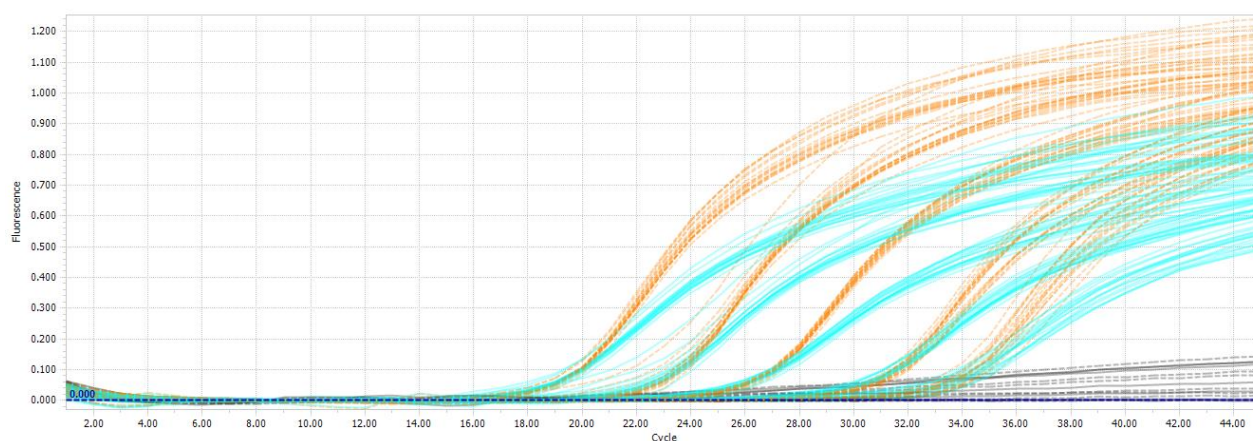


Рисунок 3.32 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 5 цикла замораживания-оттаивания

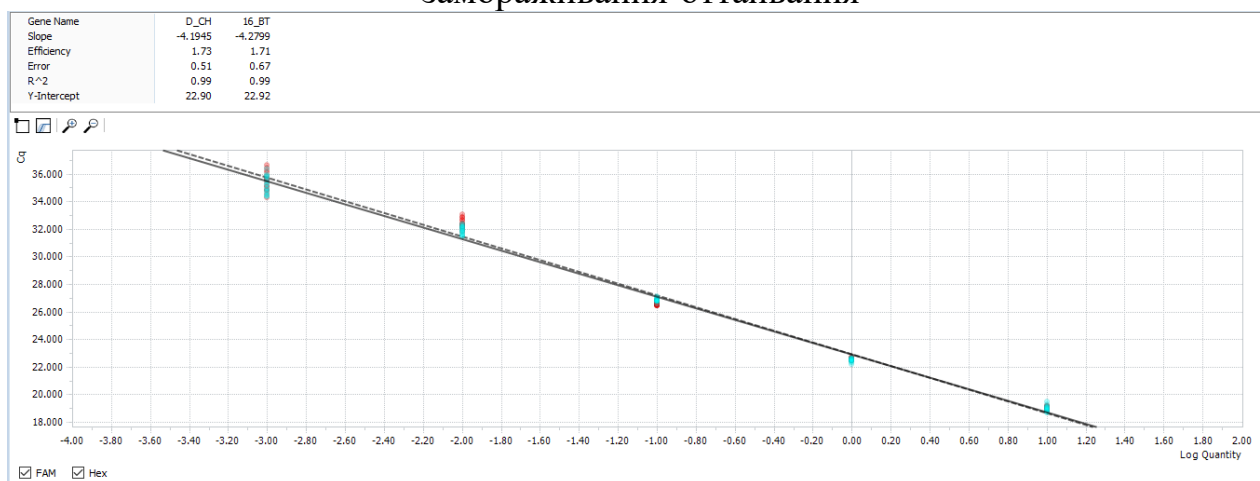


Рисунок 3.33 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 10 цикла замораживания-оттаивания

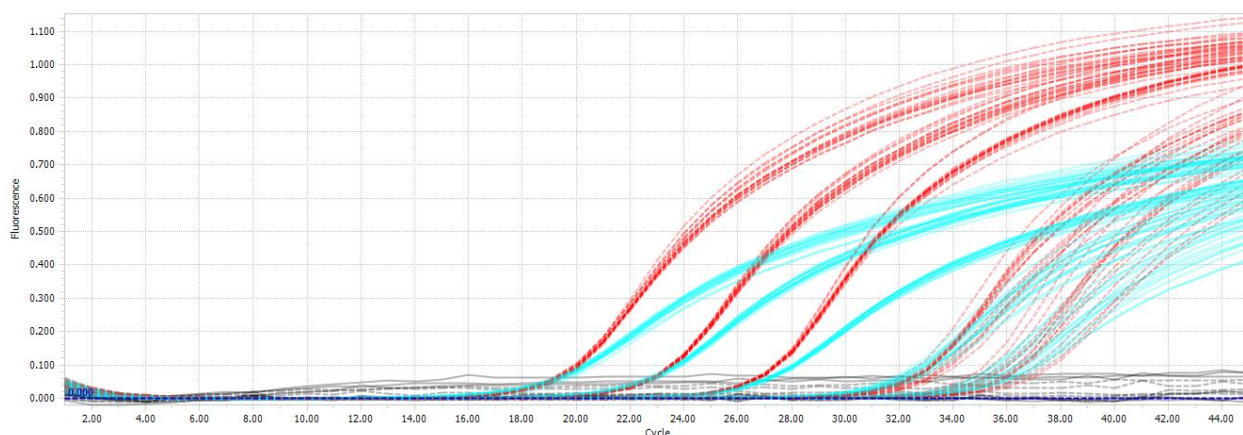


Рисунок 3.34 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus*, *C. hircus* с олигонуклеотидами D_CH + 16_BT после 10 цикла замораживания-оттаивания

Результаты исследования подтверждают, что разработанный набор реагентов стабилен при хранении и устойчив к повторным размораживаниям, поскольку значение коэффициента вариации не превышает 10% (ГОСТ Р 70150-2022 [18]). Значения CV и $C_t \pm \text{СКО}$, полученных для каждой концентрации суммарной ДНК приведены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Оценка стабильности набора реагентов для количественного определения ДНК крупного рогатого скота

Количество ДНК <i>B. taurus</i> на реакцию, нг	1 цикл		5 циклов		10 циклов		CV ₁₋₁₀ , %
	C_t , среднее $\pm \text{СКО}$	CV, %	C_t , среднее $\pm \text{СКО}$	CV, %	C_t , среднее $\pm \text{СКО}$	CV, %	
10	18,91 \pm 0,11	0,58	18,89 \pm 0,21	1,11	19,00 \pm 0,11	0,58	0,62
1	22,41 \pm 0,10	0,45	22,40 \pm 0,74	3,30	22,57 \pm 0,07	0,31	0,51
0,1	25,85 \pm 0,10	0,39	26,06 \pm 0,18	0,69	26,52 \pm 0,05	0,19	1,31
0,01	29,47 \pm 0,31	1,05	30,66 \pm 0,25	0,82	32,40 \pm 0,35	1,08	4,83
0,001	32,72 \pm 0,33	1,01	33,48 \pm 0,50	1,49	35,49 \pm 0,68	1,92	4,34

Определение метрологических характеристик метода одновременной амплификации ДНК *Bos taurus* и ВКО

В рамках экспериментальных исследований был также разработан молекулярно-генетический метод с использованием ВКО. В качестве ВКО был выбран плазмидный вектор pAL2-T, широко применяемый в методах молекулярного клонирования. Внедрение ВКО в реакционную смесь позволяет проводить мониторинг качества проведения ПЦР-анализа и подтверждать достоверность отрицательных результатов.

Оценка сходимости результатов амплификации ДНК *Bos taurus* проводилась одним оператором на одном приборе в один день дважды с применением набора олигонуклеотидов 16_BT+vko_P. Результаты показаны на рисунках 3.35-3.38.

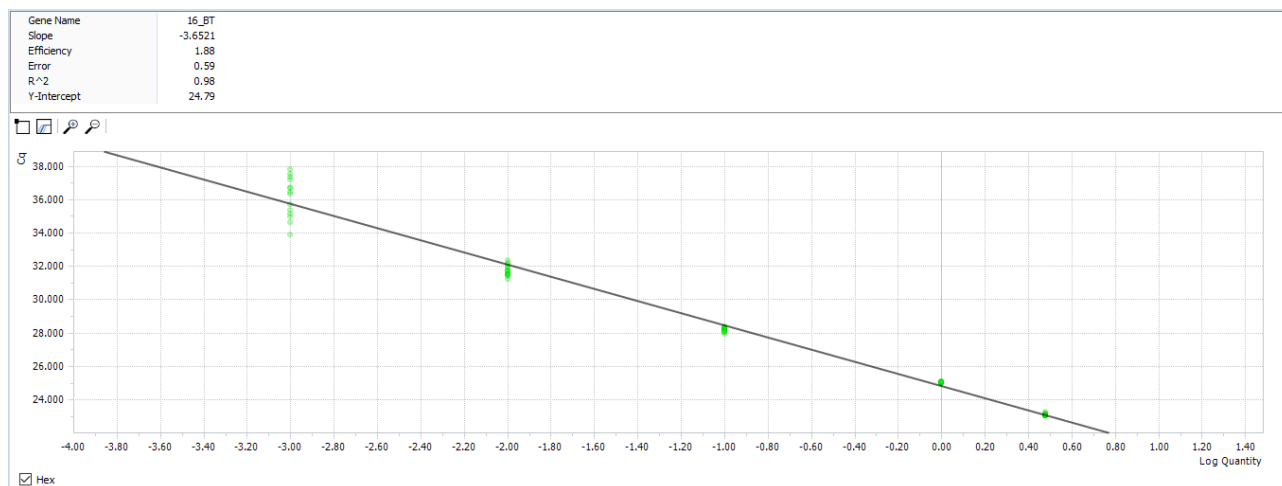


Рисунок 3.35 – График стандартной кривой при оценке сходимости результатов определения ДНК *B. taurus*

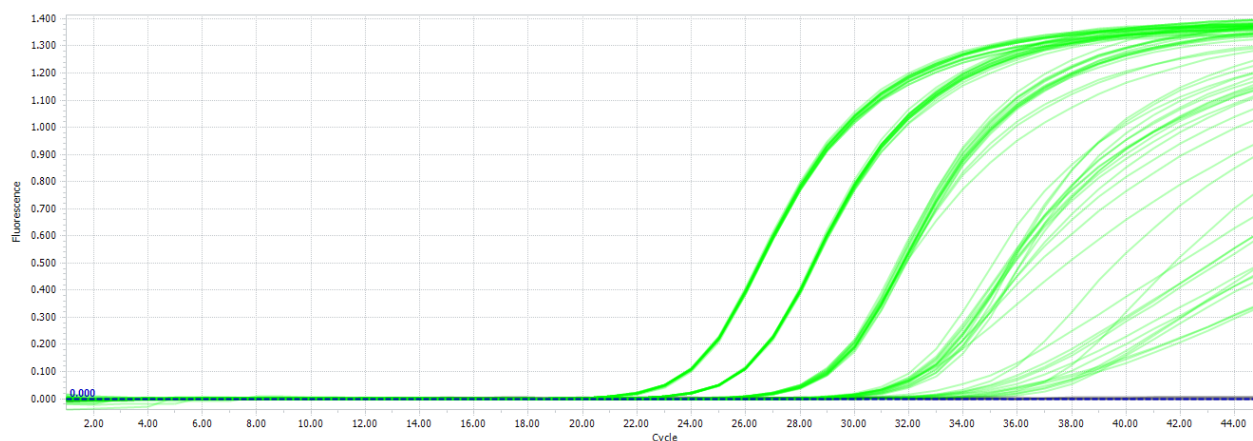


Рисунок 3.36 – Графики кривых амплификации при оценке сходимости результатов определения ДНК *B. taurus*

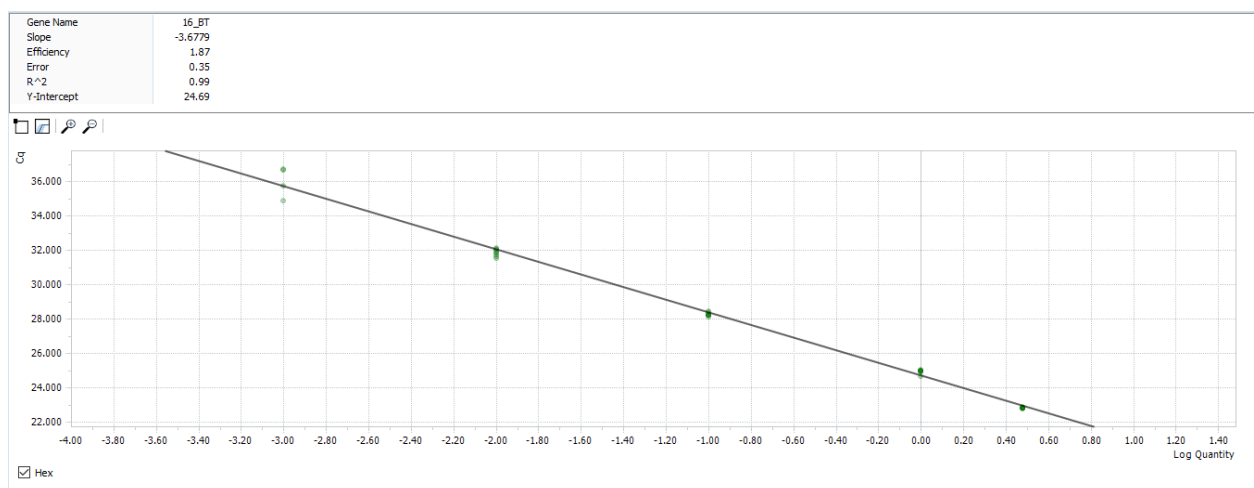


Рисунок 3.37 – График стандартной кривой при оценке сходимости результатов определения ДНК *B. taurus*

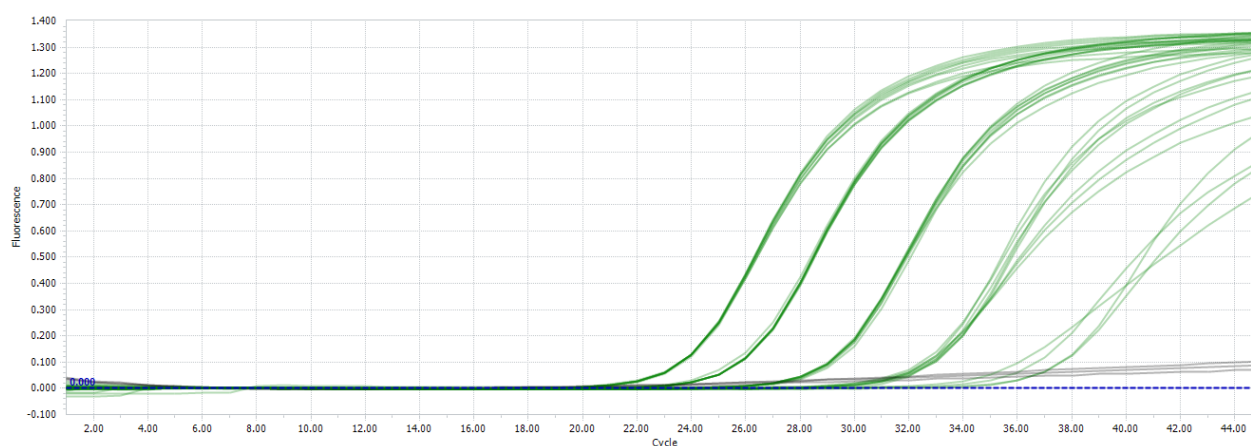


Рисунок 3.38 – Графики кривых амплификации при оценке сходимости результатов определения ДНК *B. taurus*

Оценка сходимости результатов ПЦР-РВ показала, что коэффициент вариации между значениями C_t , полученных для каждой точки в 24 повторах не превышал 3%, что говорит об их сходимости (таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Оценка сходимости результатов амплификации ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ

Концентрация ДНК, нг/мкл	C_t , среднее	C_t , среднееквадратическое отклонение	CV, %
3	23,00	0,14	0,60
1	25,01	0,08	0,34
0,1	28,22	0,12	0,43
0,01	31,77	0,29	0,91
0,001	36,17	1,08	3,00

Определение воспроизводимости значений пороговых циклов при амплификации фрагментов ДНК домашнего быка с использованием ВКО методом мультиплексной ПЦР-РВ показало, что коэффициент вариации между значениями C_t , полученных для каждой точки в 16 повторах, выполненное двумя операторами, на двух различных приборах (Light Cycler96 и Rotor-Gene Q) не превышал 5,5%, что говорит об их воспроизводимости (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Оценка воспроизводимости результатов амплификации ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ

Концентрация ДНК, нг/мкл	C_t , среднее	C_t , среднееквадратическое отклонение	CV, %
3	21,67	1,19	5,50
1	23,76	1,22	5,15
0,1	27,02	1,30	4,80
0,01	30,88	1,05	3,40
0,001	37,34	1,97	5,29

Для оценки стабильности набора реагентов для одновременной амплификации ДНК *Bos taurus* и ВКО были также проведены многократные циклы замораживания-оттаивания (рисунок 3.39-3.44).

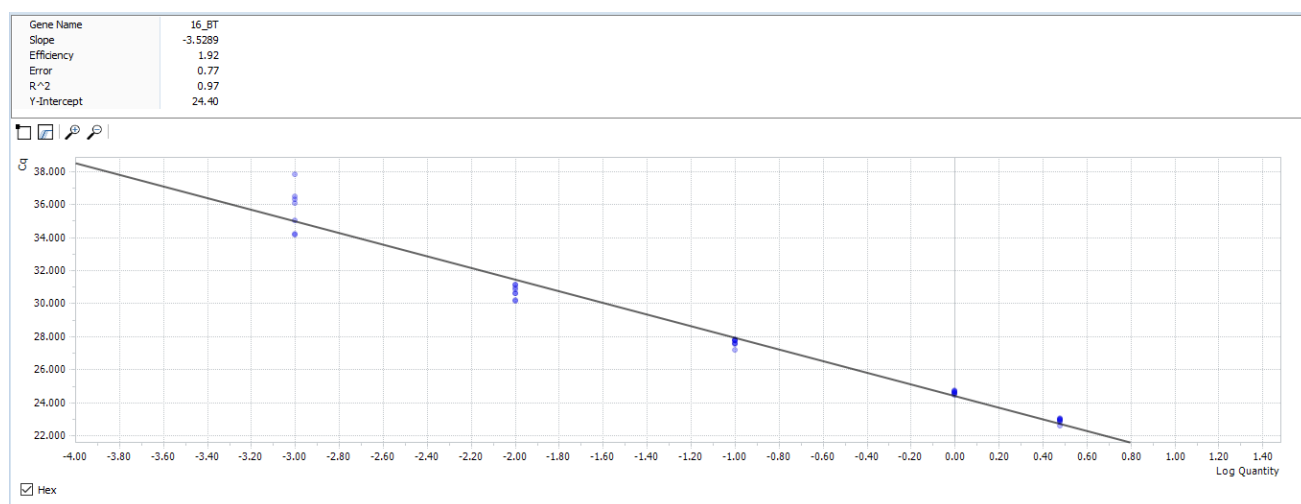


Рисунок 3.39 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 1 цикла замораживания-оттаивания

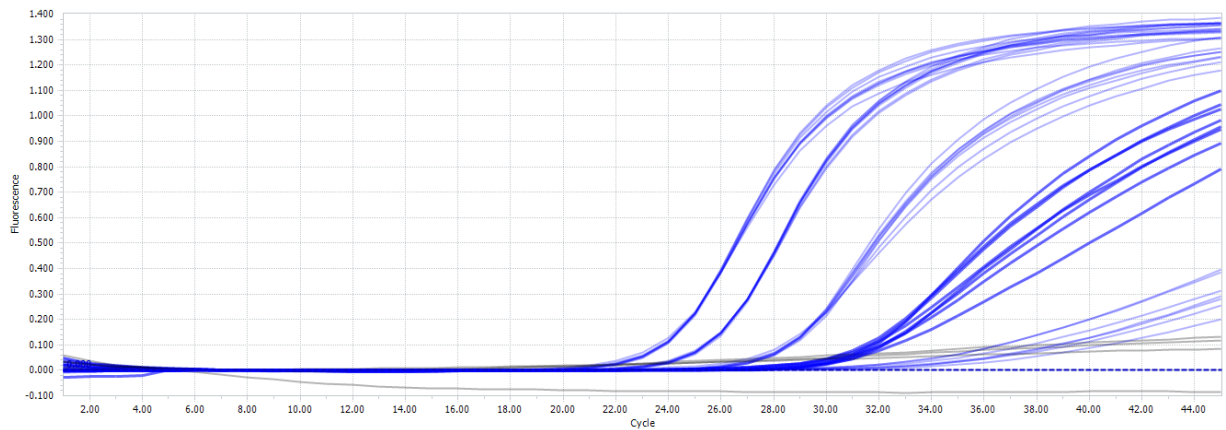


Рисунок 3.40 – Графики кривых амплификации при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 1 цикла замораживания-оттаивания

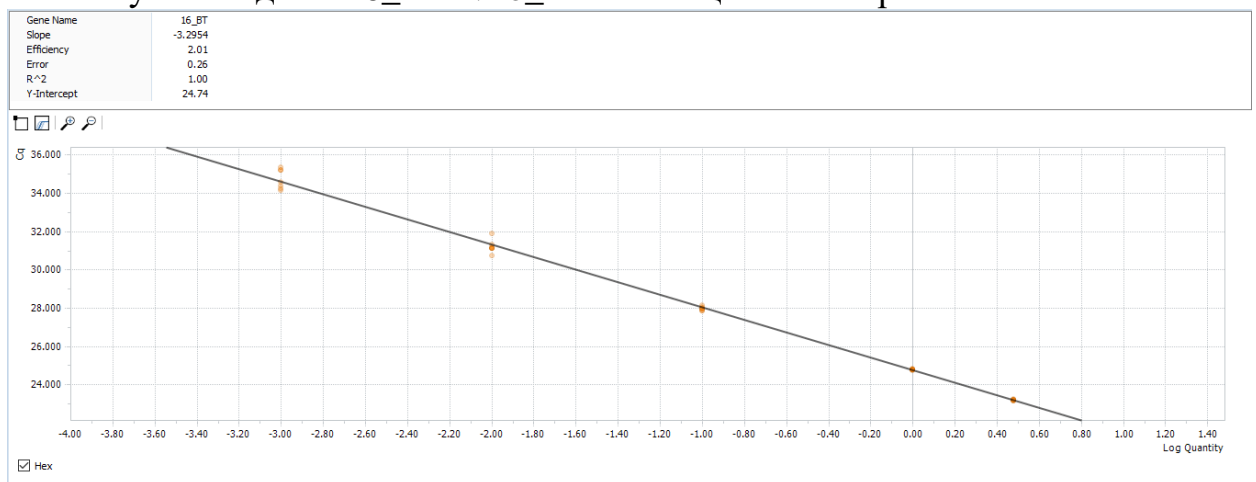


Рисунок 3.41 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 5 цикла замораживания-оттаивания

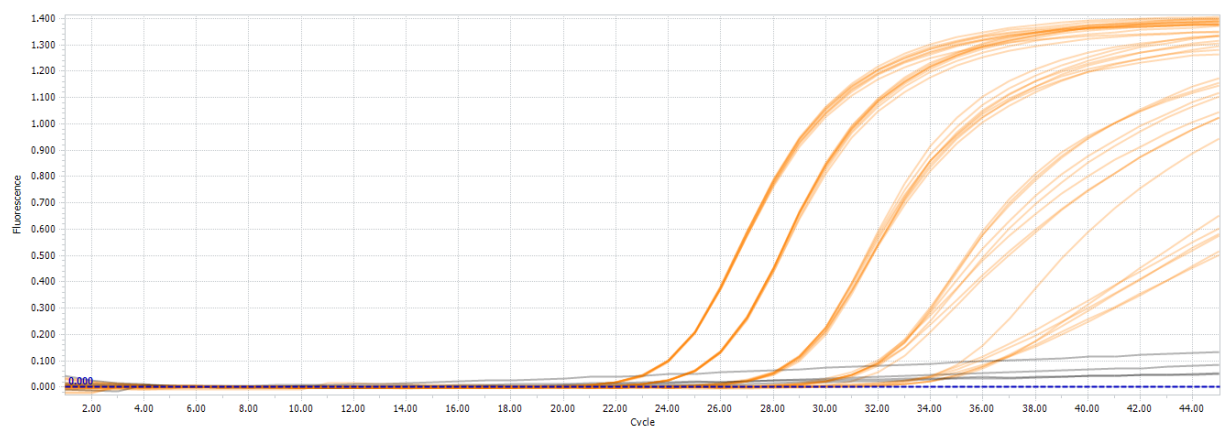


Рисунок 3.42 – Графики кривых амплификации при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 5 цикла замораживания-оттаивания

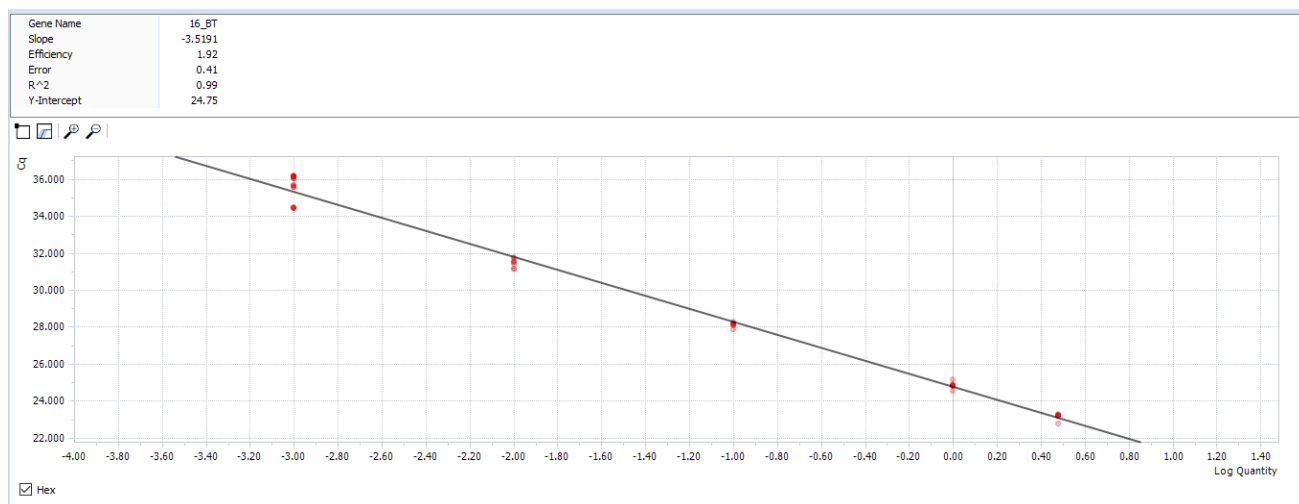


Рисунок 3.43 – График стандартной кривой при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 10 цикла замораживания-оттаивания

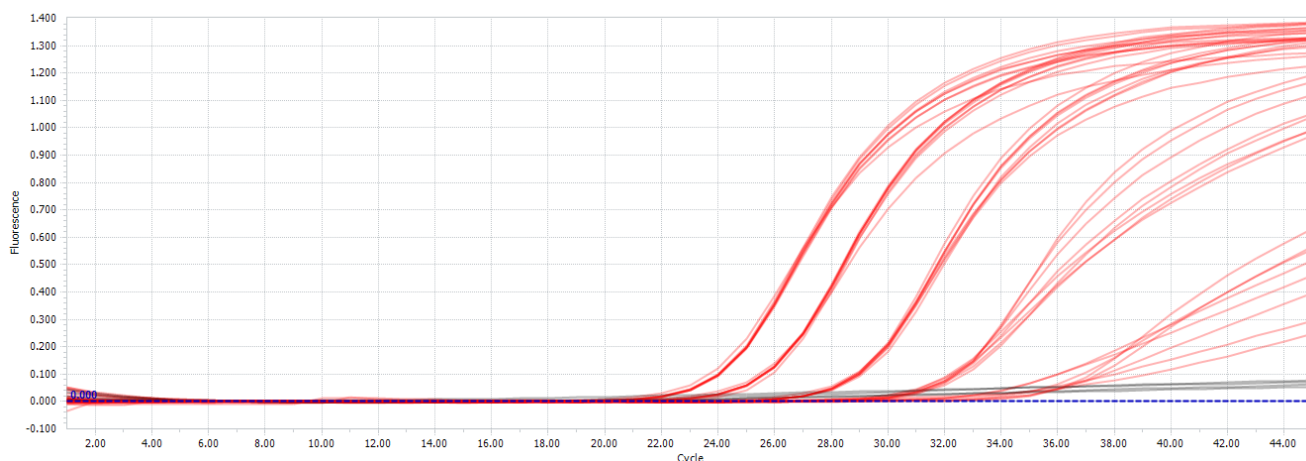


Рисунок 3.44 – Графики кривых амплификации при определении ДНК *B. taurus* с олигонуклеотидами 16_BT+vko_P после 10 цикла замораживания-оттаивания

Коэффициент вариации между значениями C_t для каждой точки находился в диапазоне от 0,71% до 2,99%. Результаты приведены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Оценка стабильности набора регентов для количественного определения ДНК крупного рогатого скота

Количество ДНК <i>B. taurus</i> на реакцию, нг	1 цикл		5 циклов		10 циклов		$CV_{1-10}, \%$
	C_t , среднее±СКО	CV, %	C_t , среднее±СКО	CV, %	C_t , среднее±СКО	CV, %	
3	22,91±0,14	0,63	23,19±0,03	0,15	23,17±0,16	0,69	0,86
1	24,62±0,09	0,39	24,79±0,02	0,09	24,84±0,17	0,70	0,71

0,1	27,63±0,21	0,76	27,97±0,09	0,33	28,12±0,12	0,42	1,09
0,01	30,70±0,39	1,26	31,21±0,31	1,01	31,47±0,23	0,72	1,60
0,001	35,70±1,33	3,72	34,85±0,55	1,58	35,58±0,73	2,06	2,99

Следовательно, разработанный набор реагентов с использованием гидролизуемых зондов технологии TaqMan стабилен при хранении и устойчив к повторным размораживаниям, поскольку значение CV не превышает 10%.

В результате проведённых исследований предлагается следующий вариант комплектации набора реагентов для проведения ПЦР-РВ анализа с использованием технологии TaqMan (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Комплектация набора реагентов

Набор	Состав набора реагентов
«ПЦР-смесь-1»	Концентрированный буфер для ПЦР, содержащий 15 ммоль MgCl ₂ , по 0,75 ммоль/мкл каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, термостабильную ДНК-полимеразу Taq в количестве 5 ед./мкл (коэффициент разбавления 5), 0,0001 нг/мкл ДНК вектора pAL2-T внутреннего контрольного образца (ВКО)
«ПЦР-смесь-2»	Водный раствор специфических праймеров и зондов для амплификации фрагментов ДНК <i>B. taurus</i> и pAL2-T
«ПКО С1»	Водный раствор с 10 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С2»	Водный раствор с 1 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С3»	Водный раствор с 0.1 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С4»	Водный раствор с 0.01 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ПКО С5»	Водный раствор с 0.001 нг/мкл ДНК <i>B. taurus</i>
«ОКО»	Деионизованная вода без нуклеиновых кислот

Все наборы реактивов в комплекте расфасованы в пластиковые микропробирки с завинчивающимися крышками, и имеют соответствующую маркировку (текстовую и цветовую), обеспечивающую их однозначную идентификацию (рисунок 3. 45).

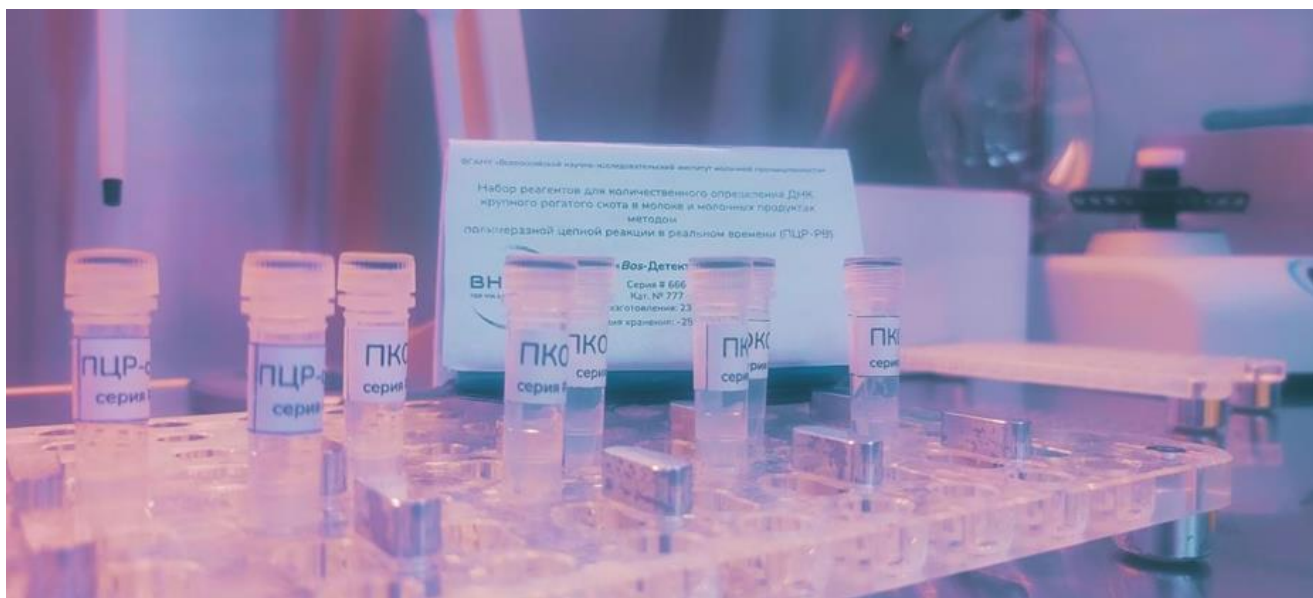


Рисунок 3.45 – Внешний вид и комплектация набора реагентов

Набор реагентов рассчитан на проведение 96 реакций, включая необходимое количество контрольных образцов. Все анализы выполняются в двух технических повторностях. Таким образом, максимальное количество анализируемых с помощью одного комплекта образцов равно 42.

Разработанный молекулярно-генетический метод позволяет проводить мультиплексный ПЦР-РВ анализ с использованием технологии TaqMan для определения коровьей ДНК в молоке и продуктах на его основе. Установлено, что данный метод обладает высокой чувствительностью, надежностью и стабильностью. При этом данный метод может быть успешно внедрен в качестве лабораторного и коммерческого анализа при идентификации видового происхождения молочных продуктов с целью выявления возможной фальсификации и подтверждения соответствия состава, заявленного производителем.

Оценка экономической эффективности

На первом этапе рассчитали себестоимость проведения молекулярно-генетического метода с применением разработанного комплекта реактивов. Результаты оценки себестоимости разработанного молекулярно-генетического анализа приведены в таблице 3.13.

Таблица 3.13 – Оценка себестоимости проведения анализа

Реактив/расходный материал	Средняя цена (100 реакций), руб.
qPCRmix-HS	1450
Деионизованная вода	80
Праймер 16_BT_F	35
Праймер 16_BT_F	35
Праймер vko_P_F	35
Праймер vko_P_R	35
Зонд 16_BT_probe	70
Зонд vko_P_probe	70
Пробирки 1,5 мл	300
Наконечники до 10 мкл одноразовые с фильтром	1100
Наконечники до 100 мкл одноразовые с фильтром	1200
Наконечники до 1000 мкл одноразовые с фильтром	1400
Тонкостенные пробирки объемом 0,2мл в стрипах по 8 штук	300
Набор СОРБ-ГМО-Б	5380
Набор Qubit BR Kit	14000
Итого:	25490 руб. (на 100 реакций) 255 руб. (на 1 реакцию)

Далее рассчитали среднее время проведения всех этапов молекулярно-генетического анализа от выделения ДНК до интерпретации результатов мультиплексной ПЦР-РВ (таблица 3.14).

Таблица 3.14 – Расчет времени проведения молекулярно-генетического анализа

Этап эксперимента	Время (час) (анализ 12 образцов)	Время (час) (анализ 42 образцов)
Выделение ДНК	2,5	$2,5 \times 3,5 = 8,75$
Измерение концентрации ДНК	2	$2 \times 3,5 = 7$
Подготовка эксперимента	2	2
Проведение ПЦР-РВ	2	2
Анализ и интерпретация результатов	0,5	0,5
Итого:	9 часов	20,25 часов

При условии, что за один цикл выделения ДНК можно максимум выделить 12 образцов и за один раунд ПЦР-РВ можно максимум исследовать 42 образца в двух технических повторностях.

Расчет часовой тарифной ставки м.н.с.

Например, если младшему научному сотруднику (м.н.с.) установлена 40-часовая рабочая неделя, его ежемесячный оклад составляет 55 000,00 руб., годовая норма рабочего времени за 2025 г. при 40-часовой неделе составляет 1972,00 час, то среднемесячное количество рабочих часов в 2025 г. – 164,3 час (1972/12). При этом часовая тарифная ставка будет равна 334,8 руб. (55 000,00 руб./164,3).

Расчет трудозатрат проводили, согласно Формуле 3.2:

$$Ч = К \times Т, \quad (3.2)$$

где Ч – искомые трудозатраты за единицу времени (чел/час), К – количество сотрудников (чел), Т – единица времени (час)

Например, если для молекулярно-генетического анализа 12 образцов в двух технических повторностях требуется 9 часов одного сотрудника, то расчет трудозатрат будет выглядеть так:

$$Ч = 1 \text{ чел} \times 9,00 \text{ час} = 9,00 \text{ чел/час}$$

Далее определяли расчет стоимости расчетных трудозатрат м.н.с., согласно Формуле 3.3:

$$Ц = ЗП \times РЧ, \quad (3.3)$$

где Ц – стоимость расчетных трудозатрат (руб.), ЗП – заработная плата м.н.с./группы м.н.с. (руб.), РЧ – количество часов (час)

При условии, что час работы м.н.с. стоит 334,8 руб.

$Ц = 334,8 \text{ руб.} \times 9 \text{ час} = 3013 \text{ руб.}$ – стоимость расчетных трудозатрат (при молекулярно-генетическом анализе 12 образцов в двух повторностях)

$Ц = 334,8 \text{ руб.} \times 20,25 \text{ час} = 6779 \text{ руб.}$ – стоимость расчетных трудозатрат (при молекулярно-генетическом анализе 42 образцов в двух повторностях).

Расчет трудоемкости

Рассчитали показатели затрат рабочего времени на выполнение молекулярно-генетического анализа, при условии, что в лаборатории работают 4 м.н.с. (таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Расчет трудоемкости проведения анализа

Показатель	Значение
Себестоимость единицы реакции, руб.	255
Объем анализа образцов за день, ед.	42
Количество смен в месяц, ед.	22
Объем исследования образцов за месяц, ед.	$42 \times 22 = 924$
Количество сотрудников, чел	4
Продолжительность смены, час	9
Отработано одним сотрудником за месяц, час	$9 \times 22 = 198$
Трудоёмкость на анализ всего объема реакций, чел. час	$4 \times 9 \times 22 = 792$
Трудоёмкость, чел. час	$792/924 = 0,85$

Сравнительный анализ методов

На данном этапе рассчитали среднее время проведения этапов хроматографического анализа образцов в двух повторностях (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Расчет времени проведения хроматографического анализа

Этап эксперимента	Время (час) (анализ 12 образцов)	Время (час) (анализ 42 образцов)
Подготовка эксперимента	0,5	0,5
Хроматографический анализ	$0,83 \times 12 \times 2 = 19,92$	$0,83 \times 42 \times 2 = 69,72$
Анализ и интерпретация результатов	0,5	0,5
Итого:	20,92 часов	70,72 часов

Провели расчет трудозатрат для хроматографического анализа.

Например, если для хроматографического анализа 12 образцов в двух повторностях требуется 20,92 часов сил одного сотрудника, то расчет трудозатрат будет выглядеть так:

$$Ч = 1 \text{ чел} \times 20,92 \text{ час} = 20,92 \text{ чел/час}$$

Затем проводили расчет работы м.н.с. при условии, что час работы м.н.с. стоит 334,8 руб:

$\text{Ц} = 334,8 \text{ руб.} \times 20,92 \text{ час} = 7004 \text{ руб.}$ – стоимость расчетных трудозатрат (при хроматографическом анализе 12 образцов в двух повторностях)

$\text{Ц} = 334,8 \text{ руб.} \times 70,72 \text{ час} = 23677 \text{ руб.}$ – стоимость расчетных трудозатрат (при хроматографическом анализе 42 образцов в двух повторностях)

Расчет разницы стоимости расчетных трудозатрат между молекулярно-генетическим и хроматографическим анализами при исследовании 12 образцов в двух повторностях:

$$7004 - 3013 = 3991 \text{ руб.}$$

Расчет разницы стоимости расчетных трудозатрат между молекулярно-генетическим и хроматографическим анализами при исследовании 42 образцов в двух повторностях:

$$23677 - 6779 = 16898 \text{ руб.}$$

Таким образом, проведена оценка экономической эффективности молекулярно-генетического метода. Себестоимость анализа одного образца составила 255 руб. Анализ временных затрат показал, что молекулярно-генетический анализ 42 образцов в двух повторностях требует 20,25 часов. Трудозатраты, составили 6779 руб. для анализа 42 образцов в двух технических повторностях.

Сравнительный анализ методов показал, что молекулярно-генетический метод позволяет сократить затраты стоимости расчетных трудозатрат на 16898 руб. при анализе 42 образцов в двух повторностях, что подчеркивает его экономическую целесообразность. Установлено, что разработанный метод обеспечивает конкурентное преимущество перед традиционными методами, такими как хроматография. Результаты обосновывают внедрение данного подхода в лабораторную практику для повышения производительности и снижения операционных расходов.

3.5 Разработка метода определения содержания коровьей ДНК в молочной продукции методом ПЦР-РВ

Применение постгеномных технологий, в частности ПЦР, позволяет определить наличие конкретного вида целевой ДНК, что обеспечивает точность, надежность и воспроизводимость результатов в молекулярно-генетических исследованиях молока и молочных продуктах. Полученные исследования позволили разработать стандарт организации СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

Настоящий стандарт был создан в соответствии с требованиями ГОСТ Р 1.4–2004 [17]. В документе детально описана область применения методики выполнения измерений, приведены нормативные ссылки, ключевые термины и определения, установлены условия выполнения экспериментальных исследований и общие требования безопасности, указанные в ГОСТ Р 70150 [18], ГОСТ Р 70296 [19], ГОСТ Р 8.1039 [20].

Требования безопасности включают общие правила, предъявляемые для организации работы и проведения молекулярно-генетических исследований в лаборатории. Определены основные требования к средствам измерений, аналитическому оборудованию, наборам реактивов и реагентов и материалам. Методика измерений подробно описывает процессы отбора и подготовки анализируемых проб, которые проводятся в соответствии с требованиями ГОСТ 26809.1 [14].

Подробно описаны все этапы проведения измерений (выделение нуклеиновых кислот, подготовка реакционной смеси, постановка ПЦР в режиме реального времени, анализ и интерпретация результатов исследования и др.). Также особое внимание уделяется высокому уровню квалификации персонала лаборатории.

Основной целью стандарта организации является выявление ДНК *Bos taurus* в продукции животноводства. СТО позволяет определить ДНК *Bos taurus* и ВКО в молочной продукции методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени

на основе технологии TaqMan. Диапазон измерений составляет от 0,001 нг до 10 нг суммарной ДНК на реакцию, что позволяет охватить широкий динамический диапазон определения целевой ДНК в анализируемых образцах.

Методика выполнения измерений предназначена для организаций, работающих на любом этапе производства молочной продукции, включая исследования в области молекулярной биологии. Настоящий стандарт позволяет обеспечить подлинность, биобезопасность и идентифицировать видовой состав образцов молока и молочной продукции, что необходимо для защиты интересов и здоровья населения.

С помощью разработанной методики выполнения испытаний можно проводить мониторинг и контроль качества молока-сырья и продуктов его переработки на всех этапах производства (Приложение А). Проведена апробация и получены соответствующие акты (Приложение Б). Таким образом, внедрение настоящего стандарта организации гарантирует защиту интересов и прав потребителей, а также помогает вести борьбу с недобросовестными производителями молочных продуктов.

3.6 Молекулярно-генетический анализ промышленных молочных продуктов

На первом этапе молекулярно-генетическое тестирование образцов промышленных молочных продуктов проводилось методом симплексной ПЦР. Для проверки подлинности и выявления содержания коровьей ДНК в молочных продуктах были выбраны праймеры ВТ-Ф и ВТ-Р, комплиментарные фрагменту 16S рРНК *Bos taurus*. Анализ методом симплексной ПЦР показал наличие ампликона размером 583 п.н. во всех образцах промышленных биойогуртов (образцы №1-5) на основе козьего молока.

В свою очередь митохондриальный участок D-петли был выбран для молекулярного подтверждения присутствия козьей ДНК в молочных продуктах с соответствующим заявленным видовым составом. ПЦР-анализ с праймерами СН-Ф и СН-Р на геном *C. hircus* показал, что во всех образцах промышленных биойогуртов из козьего молока присутствует целевой ампликон размером 184 п.н. (рисунок 3.46).



Рисунок 3.46 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами ВТ-Ф и ВТ-Р (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами СН-Ф и СН-Р (б) с образцов ДНК: №1-5 – образцы биойогуртов из козьего молока; №6 – биойогурт из коровьего молока; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Кроме того, каждый промышленный образец биоогурта был одновременно исследован методом мультиплексной ПЦР-РВ с использованием наборов олигонуклеотидов: 16_BT + D_CH и 16_BT + vko_P, положительных контрольных образцов ПКО1-5 (разведения коровьей ДНК от 10 нг/мкл до 0,001 нг/мкл), ВКО (0,0001 нг/мкл ДНК вектора pAL2-T) и ОКО (деионизированная вода) (рисунок 3.47).

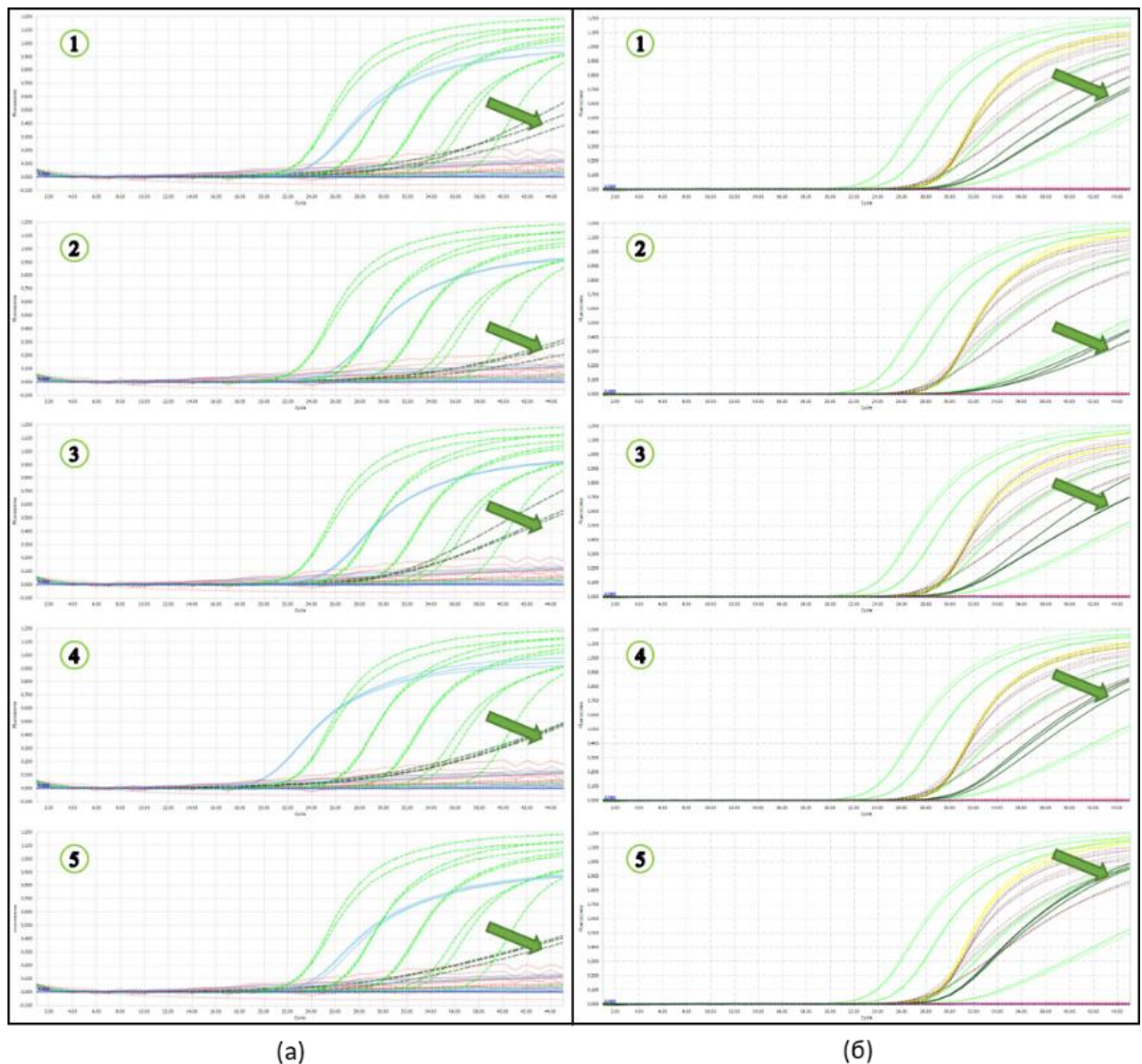


Рисунок 3.47 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленных биоогуртов из козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CH (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1-5 – образцы биоогуртов из козьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM); ● – кривые амплификации ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX); ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Cy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Cy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Cy5)

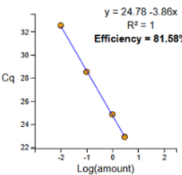
Для всех образцов промышленных биоогуртов из козьего молока (образцы №1-5) было обнаружено накопление флуоресцентных сигналов по двум каналам (HEX/FAM), что может свидетельствовать о возможной подмене козьего молока коровьим при их производстве. Следует отметить, что используемая концентрация ДНК вектора pAL2-T в реакционной смеси позволяла исключать появление ложноотрицательных результатов ПЦР в исследуемых пробах. После определяли количество ДНК *Bos taurus* в образцах кисломолочных продуктах (образцы №1-№5) с использованием сервиса «NEB General qPCR» [55] (рисунок 3.48).

qPCR Quantification
Use this tool to help calculate the amount of unknown material using qPCR data.

1. Enter values for standards.

Standards
Amount
Use Avg. C_q C_q1 C_q2 C_q3

<input checked="" type="checkbox"/>	3	22,91	22,9	22,83	22,99
<input checked="" type="checkbox"/>	1	24,86	24,93	24,75	24,90
<input checked="" type="checkbox"/>	0,1	28,53	28,46	28,57	28,57
<input checked="" type="checkbox"/>	0,01	32,54	32,74	32,37	32,51



Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	31,09	30,45	31,09	30,88	26.34 pg

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	33,92	33,13	33,94	33,66	4.996 pg

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	30,71	30,85	31,04	30,87	26.49 pg

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	30,65	31,19	30,52	30,79	27.79 pg

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	28,57	29,65	29,68	29,63	55.29 pg

Avg. Undiluted Amount.

Рисунок 3.48 – Результаты количественного определения коровьей ДНК в образцах промышленных биоогуртов из козьего молока

Оценка эффективности реакции амплификации (E) [55] представлена в Формуле 3.4:

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{slope}}\right)} - 1, \quad (3.4)$$

где slope рассчитывается по Формуле 3.5:

$$\text{slope} = \frac{(n \sum(\log[N]C_{\text{тсреднее}}) - \sum(\log[N]) \sum(C_{\text{тсреднее}}))}{n \sum(\log[N]^2) - (\sum(\log[N]))^2}, \quad (3.5)$$

где n – количество стандартов, а количество ДНК (N) находят по Формуле 3.6:

$$[N] = 10^{\left(\frac{C_t - \text{intercept}}{\text{slope}}\right)}, \quad (3.6)$$

где intercept определяли по Формуле 3.7:

$$\text{intercept} = \frac{(\sum(C_{\text{тсреднее}}) - \text{slope} \sum(\log[N]))}{n} \quad (3.7)$$

Проверка подлинности состава промышленных йогуртов из козьего молока также была выполнена методом качественной ПЦР с использованием видоспецифических олигонуклеотидов ВТ-F + ВТ-R, СН-F + СН-R (рисунок 3.49).



Рисунок 3.49 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами ВТ-F и ВТ-R (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами СН-F и СН-R (б) с образцов ДНК: №1-5 – образцы йогуртов из козьего молока; №6 – йогурт из коровьего молока; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

При этом результаты качественного ПЦР-анализа с препаратов ДНК из промышленных йогуртов на основе козьего молока, показали наличие только ампликона размером 184 п.н. После все образцы были анализированы с помощью мультиплексного ПЦР-РВ анализа с олигонуклеотидами: 16_BT + D_CH и 16_BT + vko_P (рисунок 3.50).

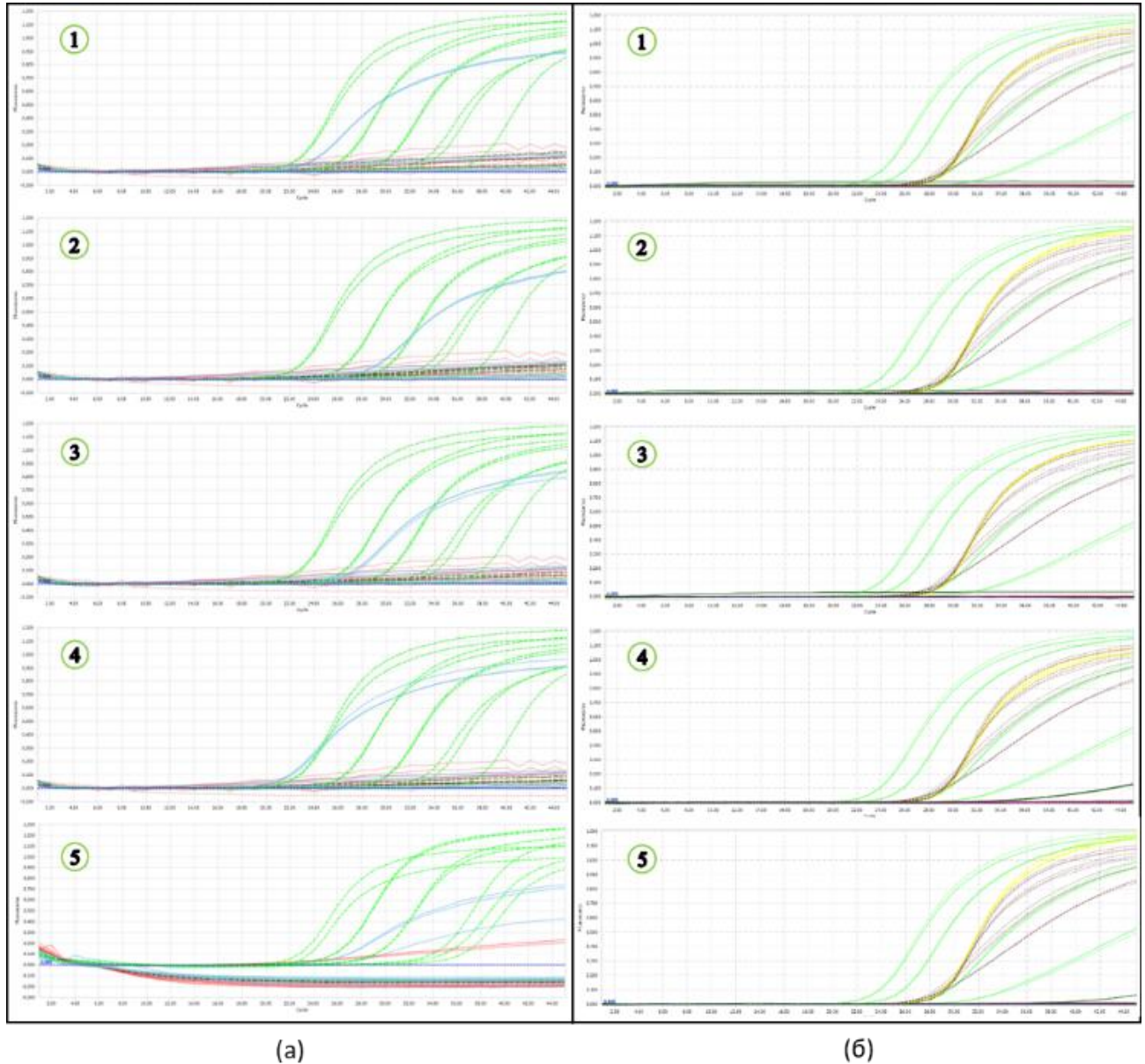


Рисунок 3.50 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленных йогуртов из козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CH (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1-5 – образцы йогуртов из козьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM); ● – кривые амплификации ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX); ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Cy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Cy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Cy5)

Установлено, что во всех образцах промышленных йогуртов из козьего молока (образцы №1-5) флуоресценция по каналу HEX отсутствовала при проведении анализа ДНК, экстрагированной из образцов данного вида продукции, что свидетельствует об отсутствии добавления примесей коровьего молока при их производстве.

При этом все кисломолочные продукты были произведены с использованием козьего молока-сырья, так как накопление флуоресцентного сигнала по каналу FAM происходила во всех исследуемых пробах. Одновременно определяли накопление флуоресцентного сигнала с ВКО по каналу Cy5 в ПКО и в исследуемых образцах.

Анализ пяти промышленных сыров методом симплексной качественной ПЦР показал, что амплификация с праймерами BT-F + BT-R наблюдалась помимо положительного контроля (K+) только в образцах сыра из коровьего молока (образец №6) и из смеси (коровьего и козьего) молока (образец №1) (рисунок 3.51). [64].

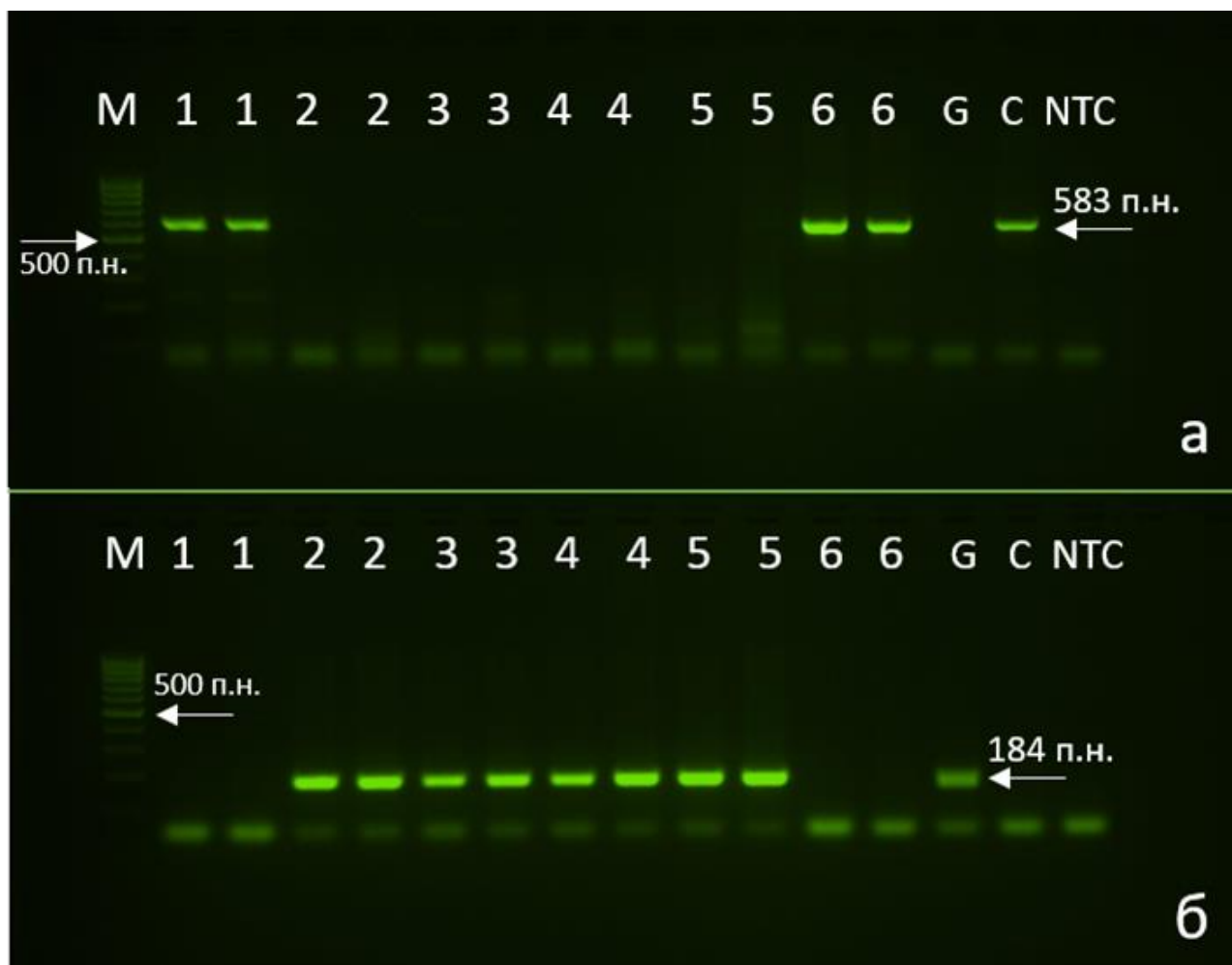


Рисунок 3.51 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами ВТ-Ф и ВТ-Р (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами СН-Ф и СН-Р (б) с образцов ДНК: №1 – сыр из коровьего и козьего молока; №2-5 – образцы сыров из козьего молока; №6 – сыр из коровьего молока; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Важно отметить, что в ходе ПЦР-анализа с праймерами СН-Ф и СН-Р было обнаружено, что в образце №1 – сыр с маркировкой «сыр с добавлением козьего молока» отсутствовал целевой продукт. При этом во всех сырах из козьего молока и в положительном контроле было показано наличие полосы бэнда, соответствующего целевому ампликону размером 184 п.н. В связи с этим, при производстве сыра №1 возможно использование только коровьего молока.

Молекулярно-генетическое тестирование выявило, что в трех пробах сыров из козьего молока (образцы №2,3,5) флуоресценция по каналу HEX отсутствовала, что свидетельствует о соответствии заявленного видового состава образцов

молочной продукции. При этом накопление флуоресцентного сигнала по каналу FAM было только в четырех сырах из пяти (образцы №2-5) (рисунок 3.52).

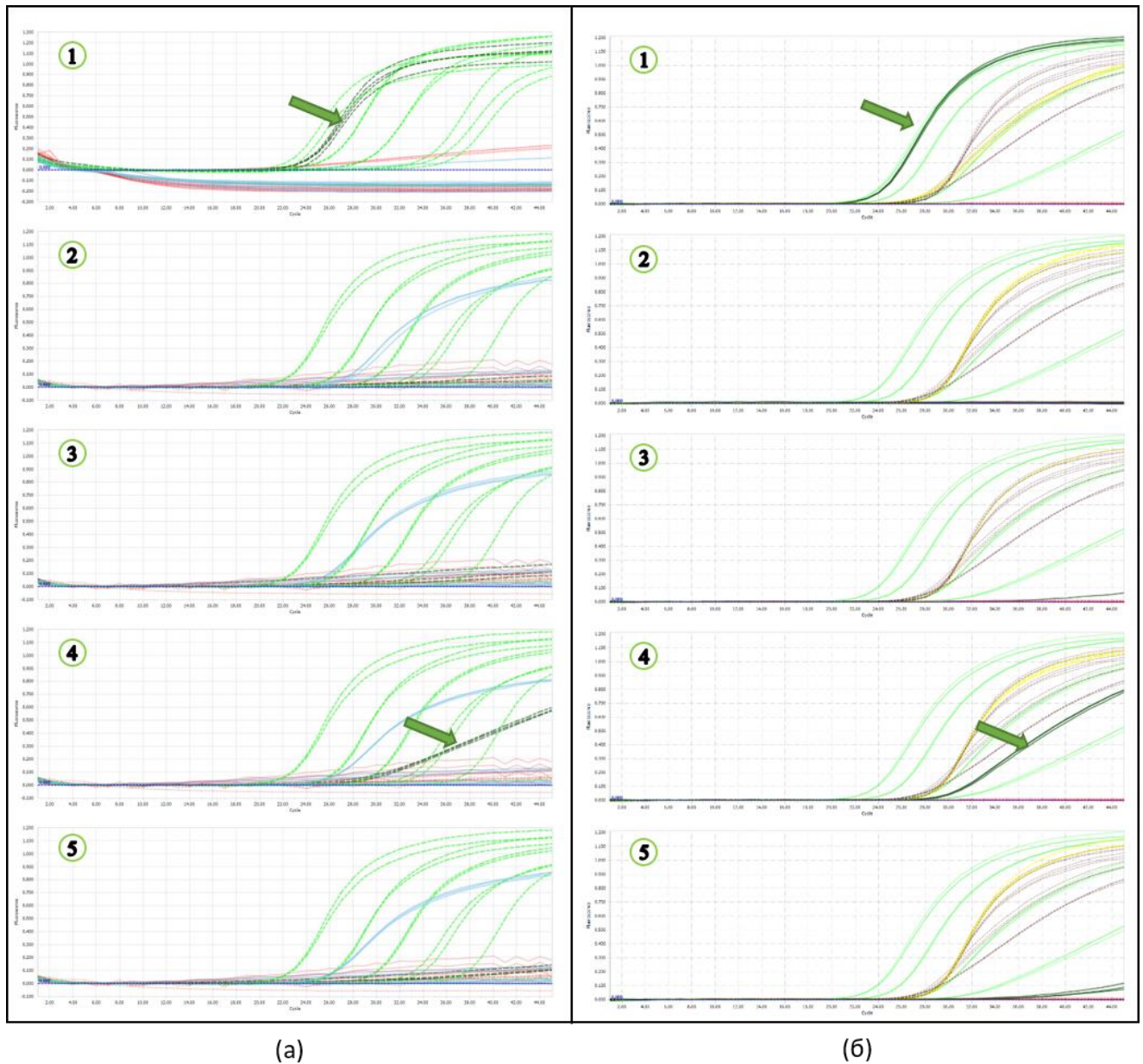


Рисунок 3.52 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленных сыров на основе козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CN (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1-5 – сыры на основе козьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM) ; ● – кривые амплификации ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX) ; ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Cy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Cy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Cy5)

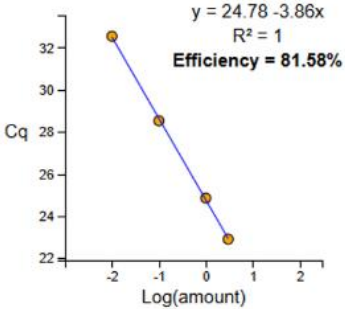
Далее определяли количество ДНК *Bos taurus* в образцах сыров (образец №1, 4) с использованием сервиса «NEB General qPCR» (рисунок 3.53).

qPCR Quantification
Use this tool to help calculate the amount of unknown material using qPCR data.

1. Enter values for standards.

Standards
Amount
Use Avg C_q C_q1 C_q2 C_q3

<input checked="" type="checkbox"/>	3	22,91	22,9	22,83	22,99
<input checked="" type="checkbox"/>	1	24,86	24,93	24,75	24,90
<input checked="" type="checkbox"/>	0,1	28,53	28,46	28,57	28,57
<input checked="" type="checkbox"/>	0,01	32,54	32,74	32,37	32,51



Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	23,33	23,38	23,31	23.34	2.361 ng

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	30,28	30,46	30,2	30.31	36.85 pg

Avg. Undiluted Amount.

Рисунок 3.53 – Результаты количественного определения коровьей ДНК в образцах промышленных сыров на основе козьего молока

Динамический диапазон с применением мультиплексной ПЦР при серийных разведениях суммарной клеточной ДНК сыра №1 определяли в пределах, охватывающих количество ДНК от 10 до 0,001 нг суммарной ДНК на реакцию (рисунок 3.54).

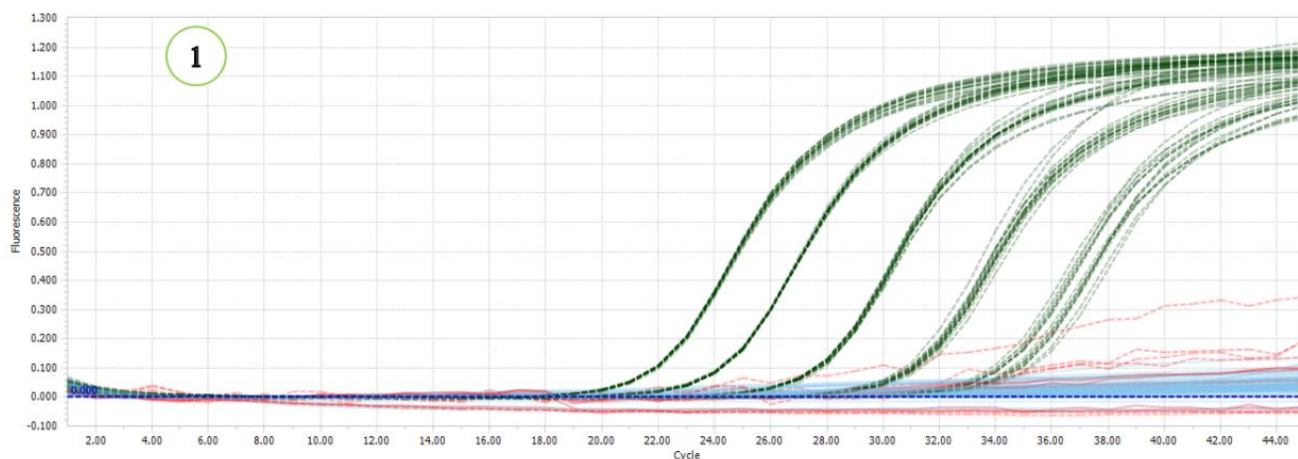


Рисунок 3.54 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе промышленного сыра (образец №1) мультиплексной ПЦР при использовании технологии TaqMan

Для каждого определяемого количества ДНК анализировали 8 повторных ПЦР-РВ реакций. Значения пороговых циклов, полученные при определении динамического диапазона, приведены в таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Значения C_t , определённых при изучении динамического диапазона реакции амплификации ДНК сыра №1

Количество суммарной ДНК, нг/реакция	(HEX)		(FAM)	
	C_t , циклов	SD, циклов	C_t , циклов	SD, циклов
5	21,03	0,07	-	-
1	23,34	0,06	-	-
0,1	26,78	0,11	-	-
0,01	30,14	0,16	-	-
0,001	33,62	0,44	-	-
ОКО	-	-	-	-

Далее в ходе анализа четырех других видов промышленных сыров методом симплексной качественной ПЦР установлено наличие ампликона 583 п.н. в двух сырах (образец №1) и (образец №3) (рисунок 3.55).

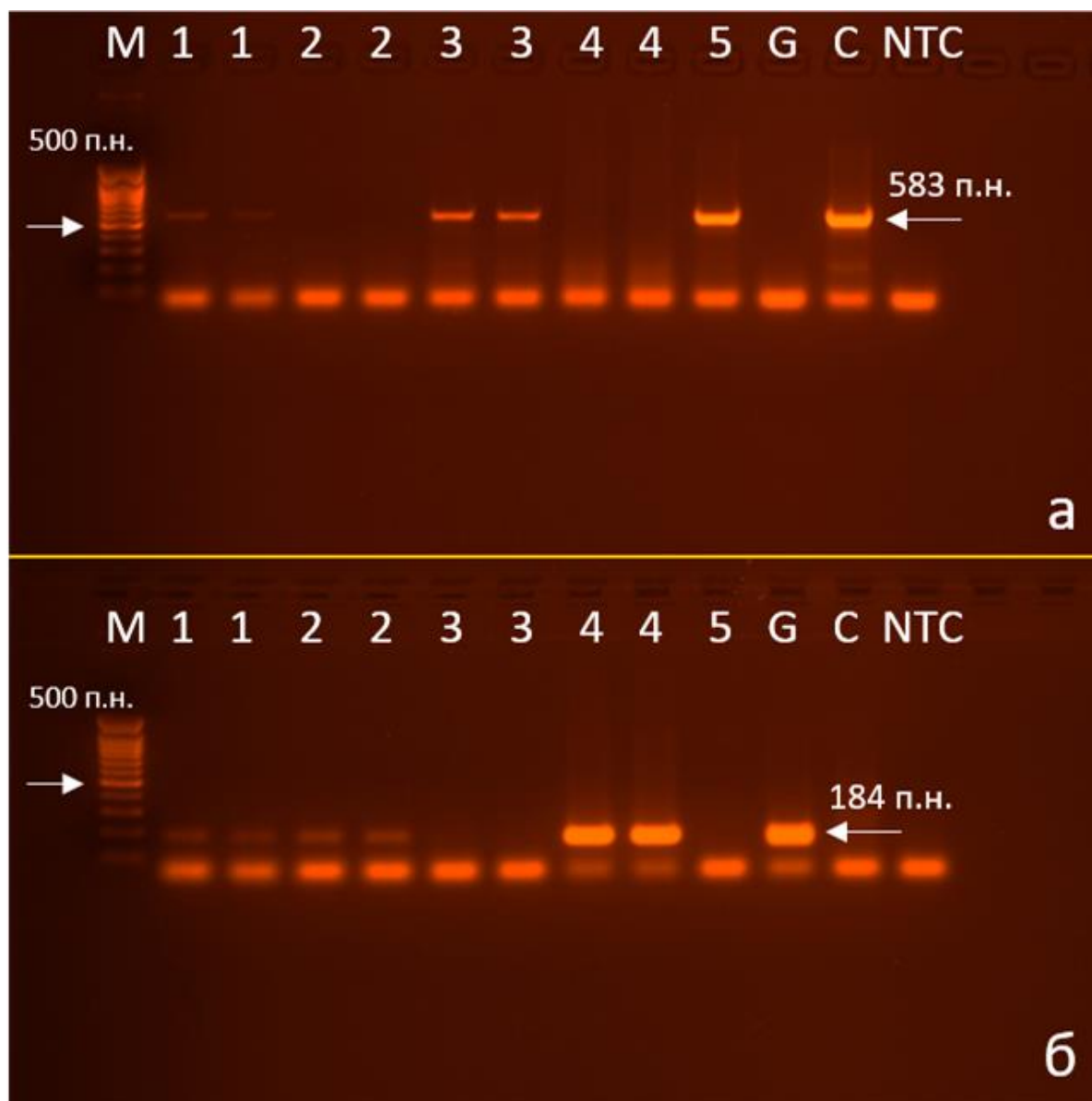


Рисунок 3.55 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами ВТ-Ф и ВТ-Р (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами СН-Ф и СН-Р (б) с образцов ДНК: №1 – сыр из коровьего, козьего и овечьего молока; №2-4 – образцы сыров из козьего молока; №5 – сыр из коровьего молока; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

При этом в отличие от сыра №1 в образце сыра №3 на этикетке не указано подмешивание коровьего молока-сырья. Кроме того, в образце сыра №3 отсутствовал фрагмент 184 п.н., что может служить признаком преднамеренной фальсификации данного продукта. Молекулярно-генетическое тестирование также подтвердило, что в двух промышленных сырах (образцы №1,3) наблюдалось накопление флуоресцентного сигнала по каналу HEX (рисунок 3.56).

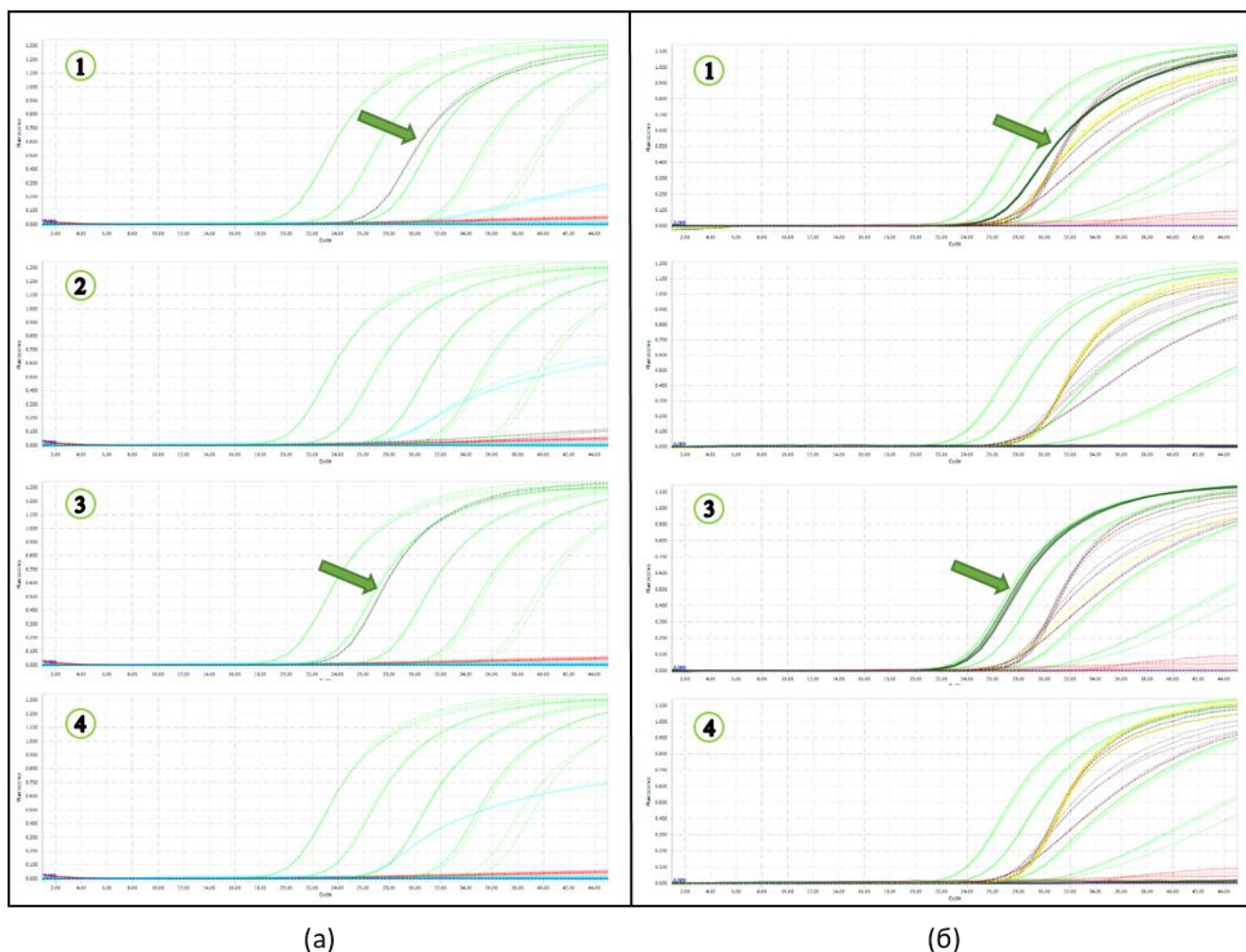


Рисунок 3.56 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленных сыров на основе козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CN (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1-5 – сыры на основе козьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM) ; ● – кривые амплификации ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX) ; ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Сy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Сy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Сy5)

Также определяли количество ДНК *Bos taurus* в образцах сыров (образец №1, 3) с использованием сервиса «NEB General qPCR» (рисунок 3.57).

qPCR Quantification

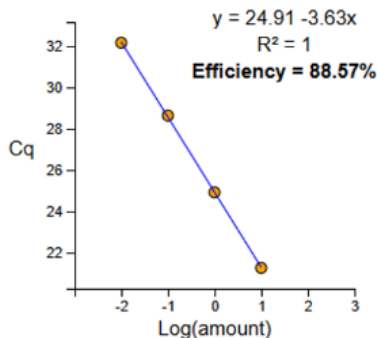
Use this tool to help calculate the amount of unknown material using qPCR data.

1. Enter values for standards.

Standards

Amount
Use Avg C_q C_q1 C_q2 C_q3

<input checked="" type="checkbox"/>	10	21,25	21,17	21,34	21,23
<input checked="" type="checkbox"/>	1	24,9	24,89	24,9	24,91
<input checked="" type="checkbox"/>	0,1	28,61	28,56	28,58	28,7
<input checked="" type="checkbox"/>	0,01	32,13	31,81	31,83	32,75



Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	25,98	25,99	25,78	25.92	528.1 pg

Avg. Undiluted Amount.

Sample Name

Dilution (1:x)	C _q 1	C _q 2	C _q 3	Avg. C _q	Undiluted Amount
1	23,33	23,52	23,66	23.50	2.441 ng

Avg. Undiluted Amount.

Рисунок 3.57 – Результаты количественного определения коровьей ДНК в образцах промышленных сыров на основе козьего молока

Идентификация состава шести проб промышленного пастеризованного молока с применением симплексной ПЦР показала наличие ДНК крупного рогатого скота не только в коровьем молоке (образец №6), но и в промышленном пастеризованном козьем молоке (образец №5). При этом амплификация с праймерами на мтДНК козы подтвердила использование козьего молока-сырья при производстве данных продуктов (образцы №1-5) (рисунок 3.58).



Рисунок 3.58 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами ВТ-Ф и ВТ-Р (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами СН-Ф и СН-Р (б) с образцов ДНК: №1-5 – образцы пастеризованного козьего молока; №6 – пастеризованное коровье молоко; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Кроме того, молекулярно-генетическое тестирование промышленных образцов молока (№1-5) также было выполнено с применением технологии TaqMan и контрольными образцами (ПКО1-5 и ОКО). При этом в пробах (№1-4) пастеризованного козьего молока также определялось накопление флуоресцентного сигнала только по каналу FAM, что исключает наличие коровьей ДНК в исследуемых продуктах. Установлено наличие флуоресцентного сигнала по каналу HEX в образце №5, что свидетельствует о потенциальном добавлении коровьего молока в процессе его производства (рисунок 3.59).

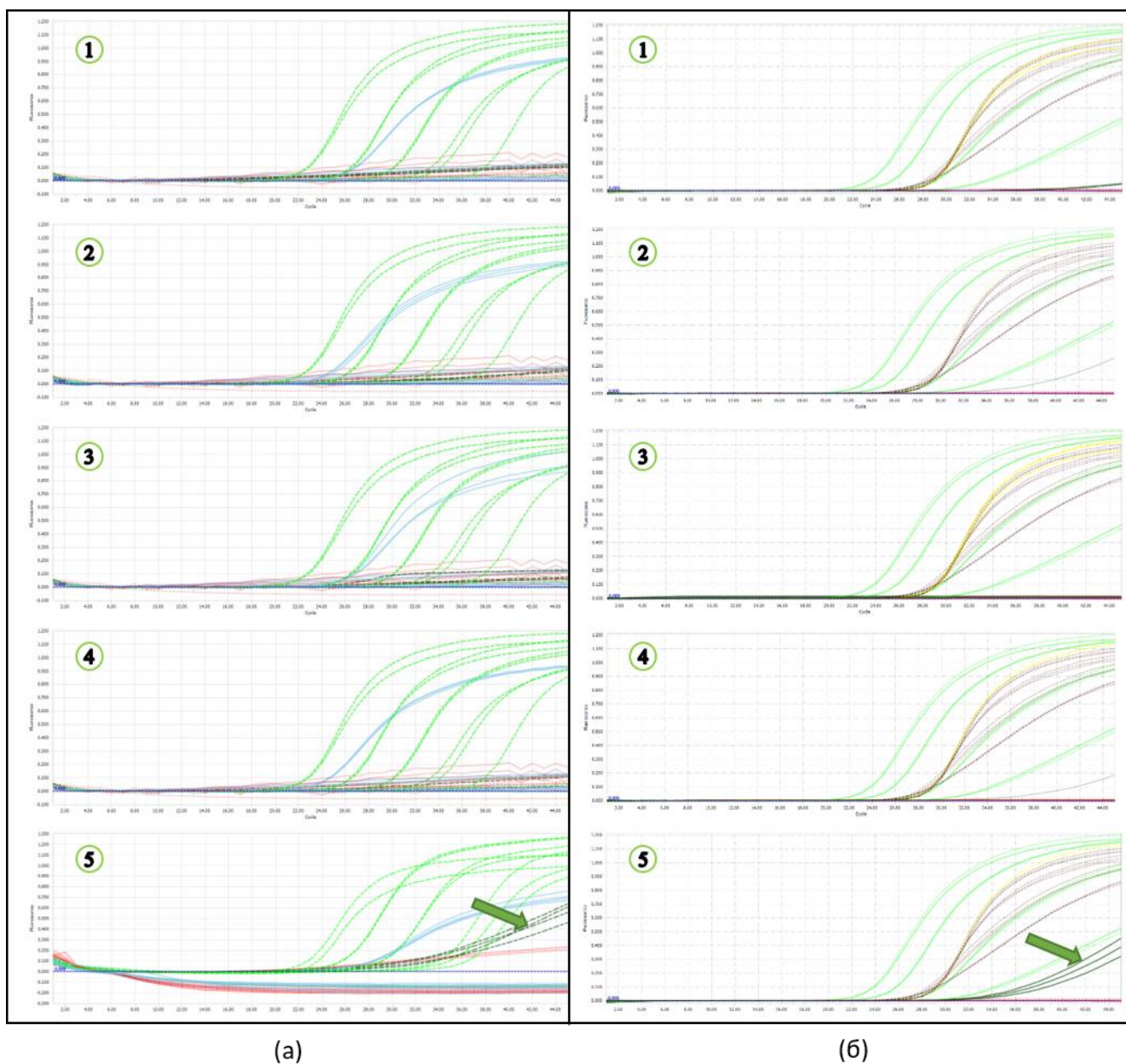


Рисунок 3.59 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленного пастеризованного козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CH (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1-5– образцы пастеризованного козьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM) ; ● – кривые амплификации коровьей ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX) ; ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Cy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Cy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Cy5)

Кроме того, определяли количество ДНК *Bos taurus* в образце пастеризованного молока (образец №5) с использованием сервиса «NEB General qPCR» (рисунок 3.60).

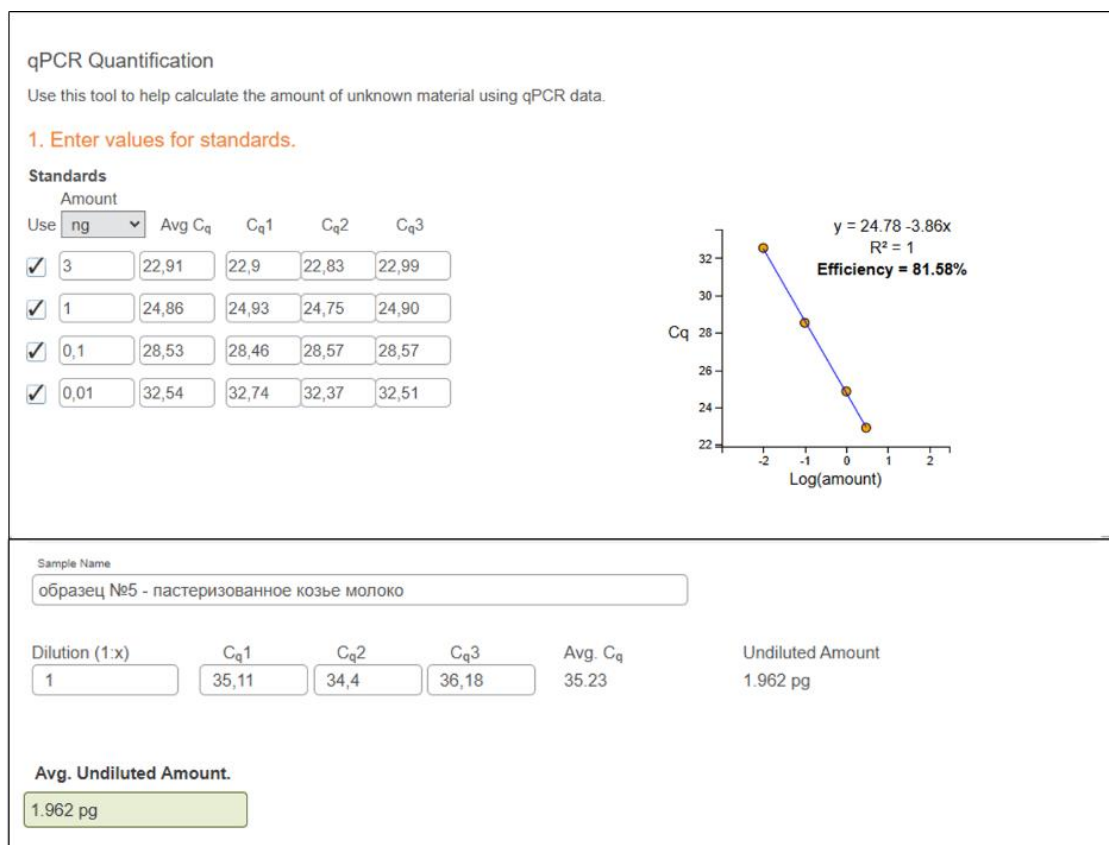


Рисунок 3.60 – Результаты количественного определения коровьей ДНК в образцах промышленного пастеризованного козьего молока

Динамический диапазон с применением мультиплексной ПЦР при серийных разведениях суммарной ДНК пастеризованного молока (образец №5) определяли в пределах, охватывающих количество ДНК от 10 до 0,001 нг суммарной ДНК на реакцию (рисунок 3.61)

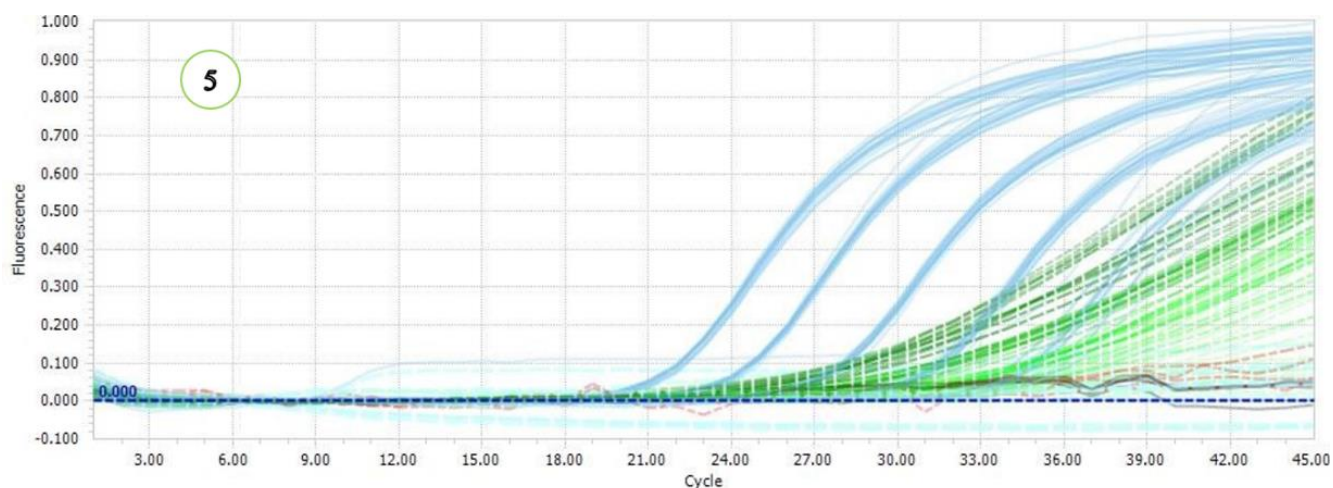


Рисунок 3.61 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе промышленного молока (образец №5) мультиплексной ПЦР при использовании технологии TaqMan

Для каждого определяемого количества ДНК анализировали 8 повторных ПЦР-РВ реакций. Значения пороговых циклов, полученные при определении динамического диапазона, приведены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Значения C_t , определённых при изучении динамического диапазона реакции амплификации ДНК пастеризованного молока №5

Количество суммарной ДНК, нг/реакция	(HEX)		(FAM)	
	C_t , циклов	SD, циклов	C_t , циклов	SD, циклов
5	25,92	0,88	21,1	0,18
1	28,49	1,59	23,68	0,17
0,1	32,32	1,11	26,98	0,25
0,01	35,02	1,07	30,39	0,33
0,001	-	-	32,47	5,97
ОКО	-	-	-	-

Результаты исследования ДНК из промышленного пастеризованного молока (образец №5) показал, что производителем данного вида продукции допущено нарушение технологического процесса, приведшее к появлению в продукции примеси коровьего молока, что, может служить признаком недобросовестной предпринимательской практики.

При анализе состава шести образцов промышленных продуктов из козьего молока методом ПЦР показала наличие ДНК крупного рогатого скота не только в продуктах из коровьего молока (образец №7-10), но и в промышленном твороге из козьего молока (образец №1). При этом амплификация с праймерами на мтДНК козы подтвердила использование козьего молока-сырья при производстве данных продуктов (образцы №1-6) (рисунок 3.62).

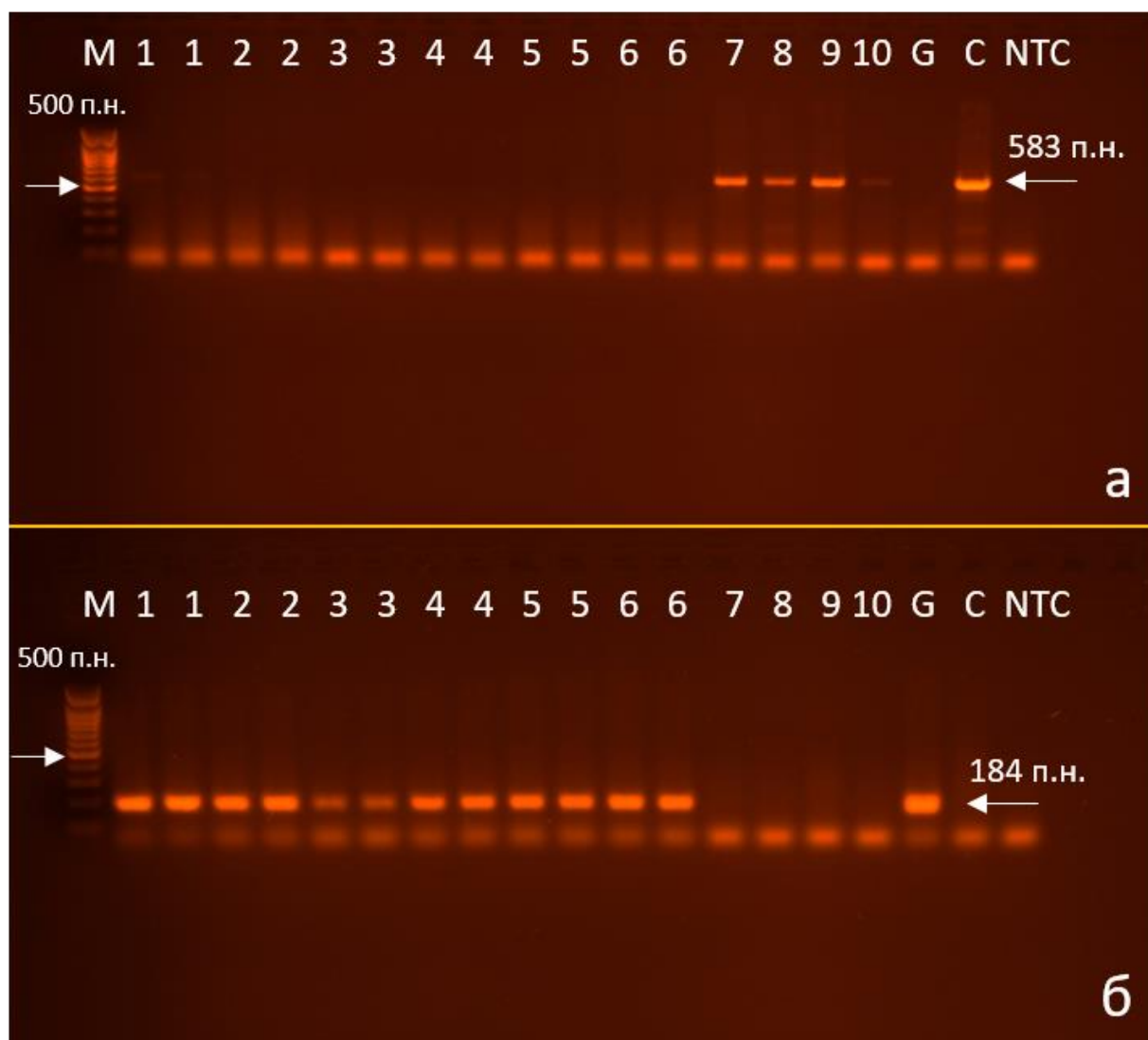


Рисунок 3.62 – Электрофореграмма типовых результатов амплификации фрагментов гена 16S рРНК *B. taurus* с праймерами BT-F и BT-R (а), участка D-петли *C. hircus* с праймерами CH-F и CH-R (б) с образцов ДНК: №1-2 – образцы творога из козьего молока; №3-4 – ультрапастеризованное козье молоко; №5 – сухое козье молоко; №6 – кефир из козьего молока; образцы 7 – творог из коровьего молока, 8 – ультрапастеризованное коровье молоко, 9 – сухое коровье молоко, 10 – кефир из коровьего молока; «G» – (геномная ДНК козы); «C» – (геномная ДНК коровы); «NTC» – (отрицательный контроль); М – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Кроме того, в результате исследования промышленных образцов (№1-6) наборами олигонуклеотидов технологии TaqMan установлено, что в образцах (№1-3) наблюдались кривые амплификации флуоресцентного сигнала по каналу HEX. При этом кривые амплификации по каналу FAM были во всех исследуемых препаратах ДНК (рисунок 3.63).

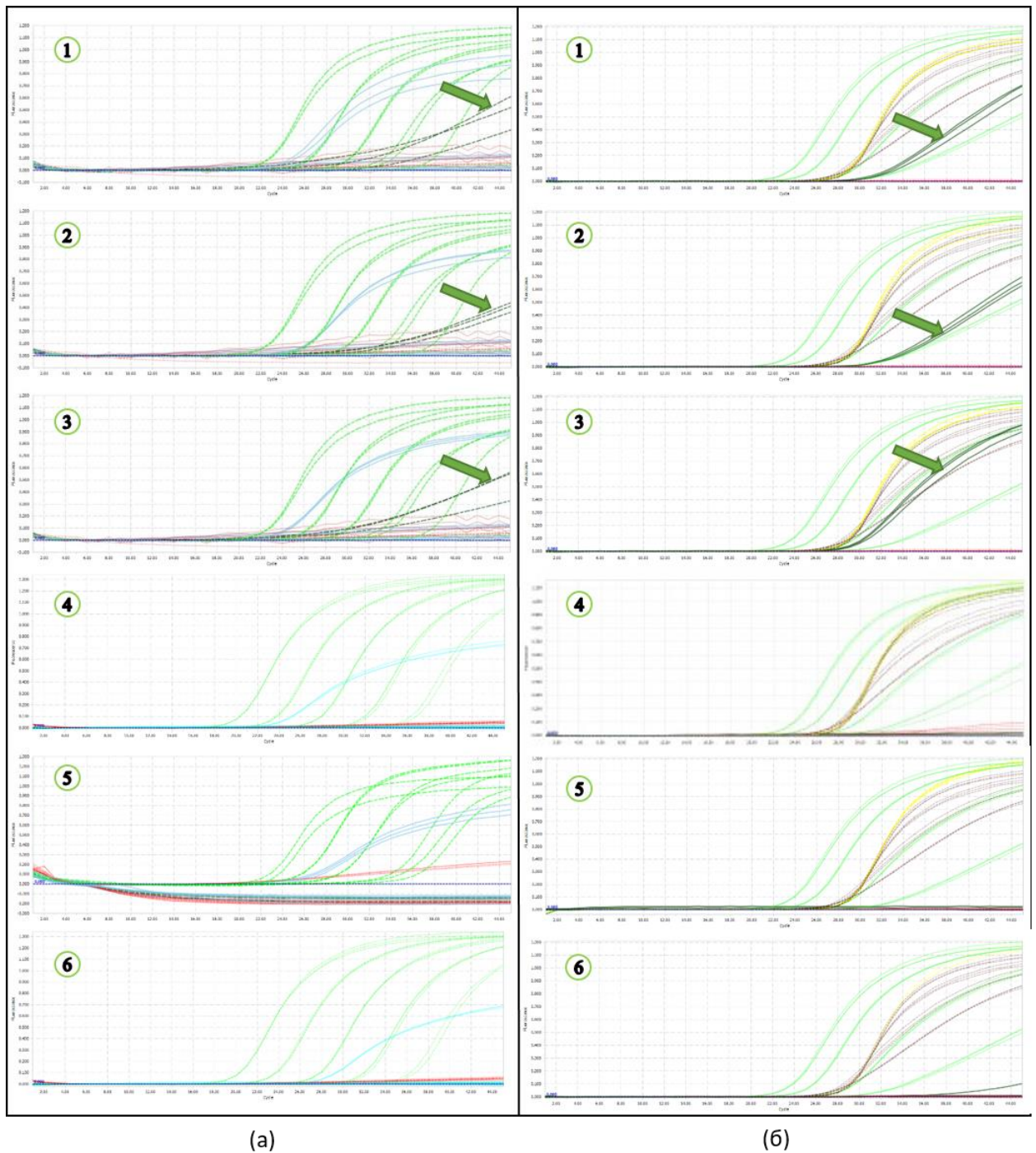


Рисунок 3.63 – Результаты определения графиков накопления флуоресцентного сигнала при анализе образцов ДНК промышленных продуктов из козьего молока с олигонуклеотидами 16_BT+D_CH (а) и 16_BT+vko_P (б): образцы №1,2 – творог из козьего молока, №3,4 – ультрапастеризованное козье молоко, №5 – сухое козье молоко; №6 – кефир из козьего молока; 7 – творог из коровьего молока, 8 – ультрапастеризованное коровье молоко, 9 – сухое коровье молоко, 10 – кефир из коровьего молока; ● – кривые амплификации козьей ДНК промышленных образцов (FAM) ; ● – кривые амплификации ПКО1-5 (HEX); ● – кривые амплификации коровьей ДНК промышленных образцов (HEX) ; ● – кривые амплификации ОКО (FAM/Cy5/HEX); ● – кривые амплификации ВКО в ПКО (Cy5); ● – кривые амплификации ВКО в промышленных образцах (Cy5)

Количество ДНК *Bos taurus* определяли в образцах продуктов на основе козьего молока (образец №1-3) с использованием сервиса «NEB General qPCR» (рисунок 3.64).

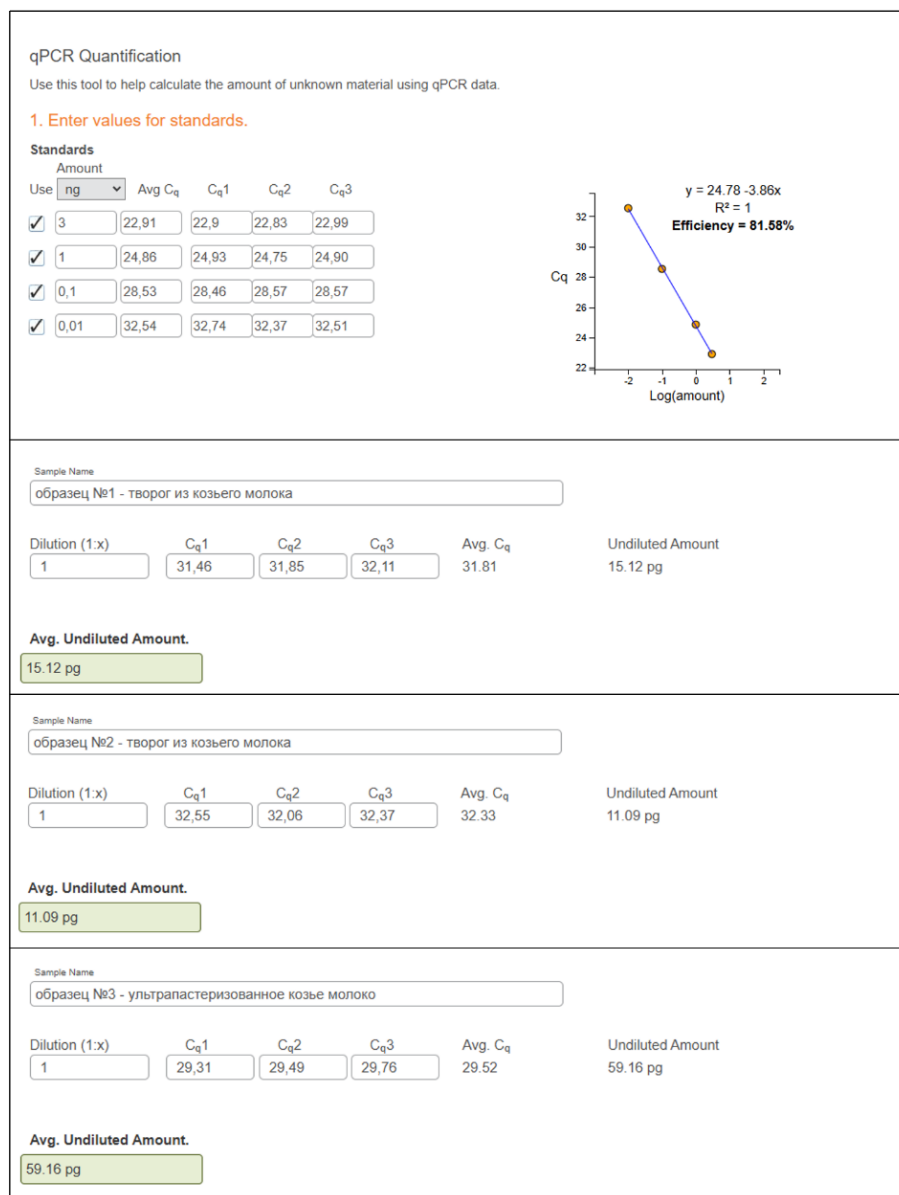


Рисунок 3.64 – Результаты количественного определения коровьей ДНК в образцах промышленных продуктов из козьего молока

Таким образом, разработанный метод количественного определения ДНК *Bos taurus* позволяет проводить видовую идентификацию козьего и коровьего молока и продуктов на их основе. Кроме того, данный молекулярно-генетический метод может быть использован для выявления видовой фальсификации в молочной промышленности.

ВЫВОДЫ

1. Проведен структурированный обзор научной литературы, освещающей вопросы идентификации и выявления фальсификации козьего молока-сырья и продуктов на его основе, с помощью молекулярно-генетических методов с целью обеспечения подлинности и безопасности молочной продукции. Установлено, что в настоящее время отсутствуют отечественные наборы реагентов для количественного определения содержания ДНК *Bos taurus* в молоке и прошедших технологическую обработку молочных продуктах.

2. Проведен сравнительный анализ эффективности пяти коммерческих наборов для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-С-М» (набор №1), «ДНК-Экстран-2» (набор №2), «Сорб-ГМО-Б» (набор №3), «ГМО-МагноСорб» (набор №4) и «К-Сорб» (набор №5). Комплект реагентов «Сорб-ГМО-Б» обеспечивает получение препаратов ДНК с высокой степенью очистки от хаотропных солей и белковых компонентов матрицы, а также максимальный выход суммарной ДНК из образцов козьего молока и продуктов на его основе.

3. Проведён биоинформатический анализ последовательностей ДНК для выявления чужеродных геномов в продуктах переработки козьего молока. Разработана панель олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченных зондов для амплификации видоспецифических участков митохондриальной ДНК домашнего скота (*Bos taurus* и *Capra hircus*) и вектора pAL2-T. Установлено, что предел количественного определения коровьей ДНК составляет 0,001 нг суммарной ДНК на реакцию.

4. Разработан молекулярно-генетический метод детекции коровьей ДНК и произведена оценка его ключевых метрологических характеристик. Сходимость результатов составляет от 0,34% до 3,00% в зависимости от количества мишени; воспроизводимость результатов составляет от 3,4% до 5,5%. Установлено, что набор реагентов для проведения ПЦР-РВ стабилен при хранении и устойчив к повторным размораживаниям, поскольку значение коэффициента вариации пороговых циклов не превышает 10%.

5. Разработана методика количественного определения ДНК домашнего быка методом ПЦР-РВ. Разработан и утвержден СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

6. Выполнено молекулярно-генетическое тестирование образцов молока и молочных продуктов из козьего молока. Анализ 31 образца фермерских и промышленных продуктов из козьего молока показало незадекларированное присутствие коровьей ДНК в 40% исследованных продуктов

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БКМ – β -казоморфин

ГХ – газовая хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖХ – жидкостная хроматография

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭФ – изоэлектрическое фокусирование

кИЭФ – капиллярное изоэлектрическое фокусирование

КРС – крупный рогатый скот

КЭ – капиллярный электрофорез

мтДНК – митохондриальная ДНК

НБА – небелковый азот

п.н. – пар нуклеотидов

ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле

ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

СКО – среднее квадратическое отклонение

СОМО – сухой обезжиренный молочный остаток

ССК – содержание соматических клеток.

СЦМ – сухое цельное молоко

St – пороговый цикл

CV – коэффициент вариации

HRM-анализ – анализ кривых плавления с высоким разрешением

LAMP – метод петлевой изотермической амплификации

LFIA – иммунологический анализ с латеральным потоком

LOD – предел обнаружения

LOQ – предел количественного определения

RPA – рекомбиназная полимеразная амплификация

Tm – температура плавления

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агарков, К. В. Актуальность разработки новых видов сухих смесей на молочной основе / К. В. Агарков, Н. С. Пряничникова // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. – С. 94-96.
2. Алексеев, А. Л. Химический состав молока и его воздействие на здоровье человека / А. Л. Алексеев, Ю. Ю. Безуглова // Наука, образование, инновации: актуальные вопросы и современные аспекты. – 2021. – С. 36-38.
3. Аникиенко, Т. И. Сертификационный аудит системы менеджмента качества / Т. И. Аникиенко, Н. И. Дунченко // Современные способы повышения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных. – 2023. – С. 230.
4. Бигаева, А. В. Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сухого коровьего молока / А. В. Бигаева, Е. Г. Лазарева, А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2023. – № 5. – С. 87-90.
5. Быстров, Д. И. Актуальные вопросы качества и безопасности продовольственного сырья, кулинарной продукции и пищевых производств. – 2022.
6. Везицкая, А. В. Сравнительная оценка жирнокислотного состава коровьего, козьего и овечьего молока / А. В. Везицкая, С. А. Ламоткин. // Технология органических веществ: Материалы 88-й научно-технической конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов (с международным участием), Минск, 29 января – 16 2024 года. – Минск: Белорусский государственный технологический университет, 2024. – С. 263-266.
7. Вишнева, Е. А. Аллергия к белкам коровьего молока. Подходы и алгоритмы лечения / Е. А. Вишнева, Л. С. Намазова-Баранова, Т. В. Турти [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11. – №. 3. – С. 65-69.

8. Воронин, Б. А. Рынок производства молока: статистика потребления и качество продукции / Б. А. Воронин, И. П. Чупина, Н. Н. Симачкова [и др.] // *International agricultural journal*. – 2020. – №. 5. – С. 28-42.
9. Воронина, О. А. Минеральные элементы в составе молока коров-мини-обзор / О. А. Воронина, Н. В. Боголюбова, С. Ю. Зайцев // *Сельскохозяйственная биология*. – 2022. – Т. 57. – №. 4. – С. 681-693.
10. Ганиева, Е. С. Сравнительный анализ биологической и пищевой ценности молока разных сельскохозяйственных животных / Е. С. Ганиева, С. Г. Канарейкина, Ф. А. Хабирова [и др.] // *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. – 2021. – №. 1. – С. 49-55.
11. Гильманов, Х. Х. Проблема фальсификации видовой принадлежности молока / Х. Х. Гильманов, Р. Р. Вафин, В. Г. Блядзе [и др.] // *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*. – 2020. – Т. 1. – № 1(1). – С. 125-129.
12. Гильмутдинова, Л. Т. Уникальный состав кобыльего молока-основа лечебных свойств кумыса / Л. Т. Гильмутдинова, Р. Р. Кудаярова, Н. Х. Янтурина // *Вестник Башкирского государственного аграрного университета*. – 2011. – №. 3. – С. 74.
13. Гинойн, Р. В. О жировых композициях, применяемых при производстве мороженого / Р. В. Гинойн, А. С. Кулаткова // *Наука и инновации в современных условиях*. – 2016. – С. 19-23.
14. ГОСТ 26809.1-2014 Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.
15. ГОСТ 31449-2013 Молоко коровье сырое. Технические условия.
16. ГОСТ 32940-2014 Молоко козье сырое. Технические условия.
17. ГОСТ Р 1.4-2004 Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения.
18. ГОСТ Р 70150-2022 «Тест-системы для диагностики болезней животных методом полимеразной цепной реакции. Общие требования и методы испытаний».

19. ГОСТ Р 70296-2022 Продукция пищевая. Метод полуколичественной оценки содержания ЖНК кур, быка домашнего, свиньи, лошади в мясной продукции, в том числе из мяса птицы
20. ГОСТ Р 8.1039-2024 «Государственная система обеспечения единства измерений. Методы измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии. Общие требования».
21. Долгошева, Е. В. Из козьего молока / Е. В., Долгошева // Редакционная коллегия. – 2025. – С. 126.
22. Жилинкова, К. Б. Проблемы фальсификации молочной продукции и их влияние на рынок молока и состояние молочной отрасли / К. Б. Жилинкова // Экономика. Информатика. – 2021. – Т. 48. – №. 4. – С. 697-706.
23. Захарова, И. Н. Использование козьего молока в питании детей раннего возраста (клинические примеры) / И. Н. Захарова, Н. Г. Сутян // Медицинский совет. – 2021. – №. 17. – С. 175-181.
24. Зимняков, В. М. Состояние, проблемы и перспективы производства молока в России / В. М. Зимняков, Г. В. Ильина, Д. Ю. Ильин [и др.] // Техника и технологии в животноводстве. – 2023. – №. 1 (49). – С. 4-10.
25. Камбурова, В. С. Оценка эффективности систем выделения ДНК для анализа ГМО в пищевых продуктах / В. С. Камбурова, Э. А. Латыпова, Т. В. Шишкина // Охрана биоразнообразия и экологические проблемы природопользования. – 2021. – С. 93-97.
26. Коваленко, Д. Н. Фальсификация молока и молочных продуктов / Д. Н. Коваленко // Переработка молока. – 2011. – №. 3. – С. 8-11.
27. Ковалюк, Н. В. Производство молока а2-перспективное направление повышения рентабельности отрасли молочного скотоводства / Н. В. Ковалюк, В. Ф. Сацук, Е. В. Мачульская [и др.] // Эффективное животноводство. – 2018. – №. 5 (144). – С. 22-23.
28. Комарова, О. Н. Возможные преимущества цельного козьего молока в детских адаптированных смесях для здорового ребенка / О. Н. Комарова // Лечащий врач. – 2021. – №. 9. – С. 9-14.

29. Комин, А. Э. К вопросу о фальсификации молока и молочных продуктов / А. Э. Комин, И. Н. Ким, И. И. Бородин // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК–продукты здорового питания. – 2020. – №. 4. – С. 62-66.
30. Крусъ, Г.Н. Технология молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусъ, А.Г. Храмцов, З.В. Волокитина [и др.]. – М.: «КОЛОСС», 2003. – 316 с.
31. Кручинин, А. Г. К вопросу зависимости технологических свойств молока от его генотипической принадлежности по каппа-казеину А. Г. Кручинин, Р. Р. Вафин, И. А. Радаева [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2020. – №. 2. – С. 52-54.
32. Куликов, П. С. Химический состав и свойства молока разных видов животных / П. С. Куликов // Молодежь и наука. – 2020. – №. 2. – С. 6-6.
33. Лазарева, Е. Г. Исследование методов экстракции ДНК из сырого молока / Е. Г. Лазарева, А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 115-116.
34. Лазарева, Е. Г. Разработка тест-системы для количественного определения провирусной ДНК Bovine leukemia virus в молоке и молочных продуктах : специальность 4.3.3 "Пищевые системы" : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Лазарева Екатерина Германовна, 2024. – 127 с.
35. Лисицын, А. Б. Управление качеством и безопасностью продукции в крупномасштабных системах / А. Б. Лисицын, М. А. Никитина, И. М. Чернуха // Управление развитием крупномасштабных систем (MLSD'2021). – 2021. – С. 876-882.
36. Мельденберг, Д. Н. Разработка комплексной оценки белкового состава молока сырья различных сельскохозяйственных животных для выработки продуктов функциональной направленности / Д. Н. Мельденберг, О. С. Полякова, Е. С. Семёнова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2020. – №. 3. – С. 118-133.

37. Оганесянц, Л. А. Идентификация фальсифицированных пищевых продуктов. Термины и определения / Л. А. Оганесянц, С. А. Хуршудян, А. Н. Петров // Пищевая промышленность. – 2019. – № 7. – С. 73-76.

38. Пампура, А. Н. Козье молоко в питании детей с аллергическими заболеваниями: мифы и реалии / А. Н. Пампура, Т. Э. Боровик, И. Н. Захарова // Вопросы современной педиатрии. – 2012. – Т. 11. – №. 3. – С. 102-107.

39. Патент № 2560579 С2 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68 С07Н 21/00. Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации ДНК животных в кормах и мясных продуктах: № 2011118970/10: заявл. 12.05.2011: опубл. 20.08.2015 / О. В. Прусакова, К. А. Глухова, И. П. Белецкий; заявитель Общество с ограниченной ответственностью "Биоарсенал" (ООО "Биоарсенал").

40. Патент № 2678090 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/6 G01N 27/00. Способ подтверждения аутентичности вареных колбасных изделий: № 2018119604: заявл. 28.05.2018: опубл. 23.01.2019 / Л. И. Ковалев, М. А. Ковалева, Н. Л. Вострикова, И. М. Чернуха; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН.

41. Патент № 2694713 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Способ идентификации видовой принадлежности баранины и говядины в продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах: № 2018134645: заявл. 01.10.2018: опубл. 16.07.2019 / Д. В. Малышев, О. Ю. Черных, А. А. Котельникова [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина".

42. Патент № 2702858 С1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/68. Тест-система для идентификации видовой принадлежности баранины и говядины в продовольственном сырье, кормах и пищевых продуктах: № 2018134646: заявл. 01.10.2018: опубл. 11.10.2019 / О. Ю. Черных, А. А. Котельникова, В. А. Баннов [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное

учреждение высшего образования "Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина".

43. Петров, А. Н. Актуальные аспекты противодействия фальсификации пищевых продуктов / А. Н. Петров, Р. А. Ханферьян, А. Г. Галстян // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 5. – С. 86-92.

44. Помогаева, Е. А. Оценка показателей биологической ценности молока, различных видов лактирующих сельскохозяйственных животных, при его заморозки / Е. А. Помогаева, А. Н. Гундарева, О. И. Жукова // Актуальные вопросы естествознания. – 2020. – С. 161-166.

45. Пономарев, А. Н. Фальсификация молока и молочных продуктов / А. Н. Пономарев, Е. И. Мельникова // Молочная промышленность. – 2018. – №. 2. – С. 44-45.

46. Просеков, А. Ю. Анализ состава и свойств белков молока с целью использования в различных отраслях пищевой промышленности / А. Ю. Просеков, М. Г. Курбанова // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – №. 4. – С. 68-71.

47. Садовой, В. В. Жирнокислотный состав козьего и овечьего молока и его трансформация в процессе производства йогурта / В. В. Садовой, Т. В. Вобликова, А. В. Пермяков // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49. – №. 4. – С. 555-562.

48. Сайт ежедневных новостей молочного рынка. [Электронный ресурс: <https://dairynews.today/kz/news/global-goat-milk-products-market-to-reach-20-75-billion-by-2029.html>. Дата доступа: 20.09.2024].

49. Сайт Национального союза производителей молока. [Электронный ресурс: <https://souzmoloko.ru/news/postreliz-15-molochnye-sessii.html?ysclid=lemo8nsaj7685446157>. Дата доступа: 15.10.2024]

50. Сайт Новости и аналитика молочного рынка. [Электронный ресурс: <https://milknews.ru/longridy/Chto-proishodit-na-rynke-kozego-moloka.html>. Дата доступа: 28.11.2024].

51. Сайт Портал органов власти Чувашской Республики [Электронный ресурс: <https://gkan.cap.ru/news/2022/02/14/kachestvo-i-bezopasnostj-molochnoj-produkcii>. Дата доступа: 20.03.2023].
52. Сайт Управление Роспотребнадзора [Электронный ресурс: <https://roscontrol.com>. Дата доступа: 27.03.2023].
53. Сайт Федеральный институт промышленной собственности [Электронный ресурс: <https://www.fips.ru>. Дата доступа: 28.11.2024]
54. Сайт Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс: <https://rosstat.gov.ru>. Дата доступа: 15.11.2024].
55. Сайт Nebiocalculator. [Электронный ресурс: <https://nebiocalculator.neb.com>. Дата доступа: 28.11.2024].
56. Сайт Statista. Dairy products & eggs worldwide: Statista's forecast. [Электронный ресурс: <https://www.statista.com>. Дата доступа: 12.08.2024].
57. Сайт Statista. Insights and facts across 170 industries and 150+ countries. [Электронный ресурс: <https://www.statista.com/topics/4649/dairy-industry/#topicOverview>. Дата доступа: 05.11.2024].
58. Сайт The Business Research Company [Электронный ресурс: <https://www.thebusinessresearchcompany.com>. Дата доступа: 28.11.2024].
59. Самойлов, А. В. Сезонные изменения жирнокислотного состава коровьего молока / А. В. Самойлов, Е. Ю. Колпаков, Н. М. Сураева [и др.] // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2017. – №. 9. – С. 35-40.
60. Симоненко, С. В. Методы идентификации молока и молочной продукции / С. В. Симоненко, Е. С. Симоненко, Т. А. Антипова [и др.] // Пищевая промышленность. – 2019. – №. 4. – С. 92-94.
61. Тетерева Л. И. Фальсификация молока водой / Л. И. Тетерева, О. В. Лепилкина, В. Е. Шутов // Молочная промышленность. – 2009. – №. 1. – С. 23-24.
62. Турлий, С. И. Современные тенденции развития мирового рынка молока и молочной продукции / С. И. Турлий // Вестник Адыгейского

государственного университета. Серия 5: Экономика. – 2020. – №. 2 (260). – С. 62-70.

63. Хан, А. В. К вопросу применения мультиплексной прямой ПЦР для оценки подлинности козьего молока / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Научное обеспечение технологического развития и повышения конкурентоспособности в пищевой и перерабатывающей промышленности: Сборник материалов 4-й Международной научно-практической конференции, Краснодар, 26–27 ноября 2024 года. – Краснодар: Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова, 2024. – С. 160-163.

64. Хан, А. В. К вопросу применения ПЦР для видовой идентификации молочной продукции / А. В. Хан, Д. Д. Коваль // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. – 2024. – № 1. – С. 277-282.

65. Хан, А. В. Молекулярные методы аутентификации молочного сырья в сыре: обзор / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Сыроделие и маслоделие. – 2024. – № 2. – С. 40-47.

66. Хан, А. В. Поиск оптимальных методов выделения ДНК из козьего молока и продуктов его переработки / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева [и др.] // Молочная промышленность. – 2024. – № 5. – С. 42-47.

67. Хан, А. В. Проблема фальсификации молочных продуктов: анализ состояния и пути решения / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 54-56.

68. Хан, А. В. Разработка тест-системы на основе мультиплексной ПЦР в реальном времени для идентификации продуктов из козьего молока / А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, Д. Д. Коваль [и др.] // Пищевая промышленность.

69. Хан, А. В. Сравнительный анализ симплексной и дуплексной ПЦР для выявления фальсификации козьего молока и продуктов его термической обработки / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева [и др.] // Пищевая метаинженерия. – 2024. – Т. 2. – № 3. – С. 12-24.

70. Харитонов, Е. Л. Кормовые и метаболические факторы формирования жирнокислотного состава молока у коров / Е. Л. Харитонов, Д. Е. Панюшкин // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2016. – №. 2. – С. 76-106.
71. Хуршудян, С. А. Качество пищевых продуктов. Термины, определения и противоречия / С. А. Хуршудян, А. Г. Галстян // Контроль качества продукции. – 2018. – № 1. – С. 48-49.
72. Цыганова, Т. Б. Система обеспечения безопасности пищевых продуктов на основе анализа рисков и определения критических контрольных точек / Т. Б. Цыганова, С. О. Смирнов // Хлебопродукты. – 2016. – № 6. – С. 38-41.
73. Шуварики, А. С. К вопросу оценки состава и свойств овечьего, козьего и коровьего молока / А. С. Шуварики, К. А. Канина, Т. О. Робкова [и др.] // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2018. – №. 1. – С. 20-22.
74. Шуварики, А. С. Качественные показатели коровьего, козьего и верблюжьего молока с учетом аллергенности / А. С. Шуварики, Е. А. Юрова, О. Н. Пастух // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2017. – №. 5. – С. 115-123.
75. Шуварики, А. С. Оценка молочной продуктивности и качества молока коз в зависимости от породы и генотипа по гену BLG (бета-лактоглобулина) / А. С. Шуварики, О. Н. Пастух, Е. В. Жукова [и др.] // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2019. – №. 3. – С. 130-148.
76. Юрова, Е. А. Применение метода пцр-анализа для определения видового состава молочного сырья / Е. А. Юрова, С. А. Фильчакова, Н. А. Жижин // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 6. – С. 16-25.
77. Юрова, Е. А. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции / Е. А. Юрова, Н. А. Жижин, С. А. Фильчакова // Вестник МГТУ. Труды Мурманского государственного технического университета. – 2020. – Т. 23, № 3. – С. 214-223.

78. Abbas, O. Analytical methods used for the authentication of food of animal origin / O. Abbas, M. Zadavec, V. Baeten [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – № 246. – P. 6-17.
79. Abedini, A. Assessment of cheese frauds, and relevant detection methods: A systematic review / A. Abedini, M. Salimi, Y. Mazaheri [et al.] // Food Chemistry: X. – 2023. № 19. – P. 100825.
80. Agrimonti, C. A quadruplex PCR (qPCR) assay for adulteration in dairy products / C. Agrimonti, A. Pirondini, M. Marmiroli [et al.] // Food Chemistry. – 2015. – № 187. – P. 58-64.
81. Alikord, M. Species identification and animal authentication in meat products: a review / M. Alikord, H. Momtaz, J. Keramat [et al.] // Journal of Food Measurement and Characterization. – 2018. – № 12. – P. 145-155.
82. Al-Samarai, F. R. Molecular markers: An introduction and applications / F. R. Al-Samarai, A. A. Al-Kazaz // European journal of molecular biotechnology. – 2015. – № 9 (3). – P. 118-130.
83. Asefa, B. Feasibility of image analysis coupled with machine learning for detection and quantification of extraneous water in milk / B. G. Asefa, L. Hagos, T. Kore [et al.] // Food Analytical Methods. – 2022. – № 15 (11). – P. 3092-3103.
84. Ayza, A. Food adulteration: its challenges and impacts / A. Ayza, E. Belete // Food Science and Quality Management. – 2015. – № 41. – P. 50-56.
85. Azad, T. Common milk adulteration and their detection techniques / T. Azad, S. Ahmed // International Journal of Food Contamination. – 2016. – № 3. – P. 1-9.
86. Banti, M. Food adulteration and some methods of detection, review / M. Banti // International Journal of Nutrition and Food Sciences. – 2020. – № 9 (3). – P. 86-94.
87. Barone, G. Calcium: A comprehensive review on quantification, interaction with milk proteins and implications for processing of dairy products / G. Barone, S. R. Yazdi, S. K. Lillevang [et al.] // Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2021. – № 20 (6). – P. 5616-5640.

88. Becskei, Z. Assessment of water buffalo milk and traditional milk products in a sustainable production system / Z. Becskei, M. Savić, D. Ćirković [et al.] // Sustainability. – 2020. – № 12 (16). – P. 6616.
89. Biadała, A. Goat's milk-derived bioactive components-a review / Biadała A., Konieczny P. // Dairy/Mljekarstvo. – 2018. – № 68 (4). – P. 239-253.
90. Bjørgan, B. The effect of season, somatic cell count and bulk milk storage time on the sensory and chemical characteristics of an aged hard goat milk cheese / B. Bjørgan, P. Varela, A. G. Johansen // International Dairy Journal. – 2025. – C. 106207.
91. Böhme, K. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics / K. Bohme, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019. – № 67 (14). – P. 3854-3864.
92. Bórawski, P. Factors shaping cow's milk production in the EU / P. Bórawski, A. Pawlewicz, A. Parzonko [et al.] // Sustainability. – 2020. – № 12 (1). – P. 420.
93. Borková, M. Possibilities of different animal milk detection in milk and dairy products—a review / M. Borková, J. Snášelová // Czech J Food Sci. – 2005. – № 23 (2). – P. 41-50.
94. Bougadi, E. T. based DNA biosensor for food authenticity testing / E. T. Bougadi, D. P. Kalogianni // Food chemistry. – 2020. – № 322. – P. 126758.
95. Canja, C. M. Foodstuff falsification—a nowadays problem / C. M. Canja, A. Mazarel, M. I. Lupu // Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series II: Forestry• Wood Industry• Agricultural Food Engineering. – 2016. – P. 69-74.
96. Chauhan, S. A review on nutritional advantages and nutraceutical properties of cow and goat milk / S. Chauhan, P. Powar, R. Mehra // International Journal of Applied Research. – 2021. – № 10. – P. 101-105.
97. Choopan, R. Simultaneous species identification in milk and dairy products using direct pcr / R. Choopan, P. Thanakiatkrai, T. Kitpipit // Forensic Science International: Genetics Supplement Series. – 2017. – № 6. – P. e214-e215.
98. Choudhary, A. An overview of food adulteration: Concept, sources, impact, challenges and detection / A. Choudhary, N. Gupta, F. Hameed // International Journal of Chemical Studies. – 2020. – № 8 (1). – P. 2564-2573.

99. Clark, S. A 100-year review: Advances in goat milk research / S. Clark, M. B. M. García // *Journal of dairy science*. – 2017. – № 100 (12). – P. 10026-10044.
100. Cosenza, G. A fast and reliable polymerase chain reaction method based on short interspersed nuclear elements detection for the discrimination of buffalo, cattle, goat, and sheep species in dairy products / G. Cosenza, M. Iannaccone, D. Gallo [et al.] // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. – 2019. – № 32 (6). – P. 891.
101. Cutarelli, A. Droplet Digital PCR (ddPCR) analysis for the detection and quantification of cow DNA in Buffalo Mozzarella Cheese / A. Cutarelli, A. Fulgione, P. Fraulo [et al.] // *Animals*. – 2021. – № 11 (5). – P. 1270.
102. da Silva Carvalho, A. C. Consumption of animal products and frauds: DNA-based methods for the investigation of authenticity and traceability in dairy and meat-derived products—a review / A. C. da Silva Carvalho, S. M. Gennari, V. M. F. Paschoalin [et al.] // *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. – 2015. – № 52 (3). – P. 183-194.
103. Danezis, G. P. Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches / G. P. Danezis, A. S. Tsagkaris, F. Camin [et al.] // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – № 85. – P. 123-132.
104. Deeth, H. Whey proteins: An overview / H. Deeth, N. Bansal // *Whey proteins*. – 2019. – P. 1-50.
105. Deng, L. Detection of the bovine milk adulterated in camel, horse, and goat milk using duplex PCR / L. Deng, A. Li, Y. Gao [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2020. – № 13. – P. 560-567.
106. DeVries J. W. Non-protein nitrogen determination: A screening tool for nitrogenous compound adulteration of milk powder / J. W. DeVries, G. W. Greene, A. Payne [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2017. – № 68. – P. 46-51.
107. Di Domenico, M. Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products / M. Di Domenico, M. Di Giuseppe, J. W. Rodríguez [et al.] // *Journal of dairy science*. – 2017. – № 100 (1). – P. 106-112.

108. Di Febo, T. Detection of undeclared bovine milk in different food matrices by a multi-technique approach / T. Di Febo, M. Schirone, M. Di Domenico [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2020. – № 111. – P. 104845.
109. Di Pinto A. DNA-based approach for species identification of goat-milk products / A. Di Pinto, V. Terio, P. Marchetti [et al.] // *Food chemistry*. – 2017. – № 229. – P. 93-97.
110. Di Pinto, A. Detection of cow milk in buffalo “mozzarella” by polymerase chain reaction (PCR) assay / A. Di Pinto, M. C. Conversano, V. T. Forte [et al.] // *Journal of Food Quality*. – 2004. – № 27 (6). – P. 428-435.
111. Domingues, L. PCR: Methods and Protocols / L. Domingues [et al.] // *Springer New York*. – 2017. P. 1-282.
112. Dordevic, D. Current knowledge of the adulteration of milk and milk products—proof method.
113. El-Agamy, E. I. Camel milk / E. I. El-Agamy // *Handbook of milk of non-bovine mammals*. YWH Park, GF Ames, Iowa. – 2006. – P. 297-344.
114. Everstine, K. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents / K. Everstine, J. Spink, S. Kennedy // *Journal of food protection*. – 2013. – № 76 (4). – P. 723-735.
115. Filipczak-Fiutak, M. Nutritional value and organoleptic assessment of traditionally smoked cheeses made from goat, sheep and cow's milk / M. Filipczak-Fiutak, A. Pluta-Kubica, J. Domagała [et al.] // *PloS one*. – 2021. – № 16 (7). – P. e0254431.
116. Fiorino, M. The intentional adulteration in foods and quality management systems: chemical aspects / M. Fiorino, C. Barone, M. Barone [et al.] // *Quality systems in the food industry*. – 2019. – P. 29-37.
117. Fox, P. F. Lactose / P. F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. McSweeney [et al.] // *Dairy chemistry and biochemistry*. – 2015. – P. 21-68.
118. Franzoi, M. Development and validation of a new method for the quantification of soluble and micellar calcium, magnesium, and potassium in milk / M.

Franzoi, G. Niero, M. Penasa [et al.] // *Journal of dairy science*. – 2018. – № 101 (3). – P. 1883-1888.

119. Gambelli, L. Milk and its sugar-lactose: a picture of evaluation methodologies / L. Gambelli // *Beverages*. – 2017. – № 3 (3). – P. 35.

120. Ganopoulos, I. A novel closed-tube method based on high resolution melting (HRM) analysis for authenticity testing and quantitative detection in Greek PDO Feta cheese / I. Ganopoulos, I. Sakaridis, A. Argiriou [et al.] // *Food chemistry*. – 2013. – № 141 (2). – P. 835-840.

121. Giglioti R. Detection and quantification of adulteration in milk and dairy products: A novel and sensitive qPCR-based method / R. Giglioti, H. Polli, B. T. Azevedo [et al.] // *Food Chemistry: Molecular Sciences*. – 2022. – № 4. – P. 100074.

122. Golinelli, L. P. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese / L. P. Golinelli, A. C. Carvalho, R. S. Casaes [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2014. – № 97 (11). – P. 6693-6699.

123. Guo, L. A simultaneous triplex TaqMan real-time PCR approach for authentication of caprine and bovine meat, milk and cheese / L. Guo, M. Ya, X. Hai [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2019. – № 95. – P. 58-64.

124. Guo, L. Simultaneous detection of ovine and caprine DNA in meat and dairy products using triplex TaqMan real-time PCR / L. Guo, Y. Yu, W. L. Xu [et al.] // *Food Science & Nutrition*. – 2020. – № 8 (12). – P. 6467-6476.

125. Guo, L. Simultaneous identification of bovine and equine DNA in milks and dairy products inferred from triplex TaqMan real-time PCR technique / L. Guo, J. P. Qian, Y. S. Guo [et al.] // *Journal of dairy science*. – 2018. – № 101 (8). – P. 6776-6786.

126. Haddad, M. PCR-based identification of bovine milk used in goat and sheep local dairy products marketed in Jordan / M. Haddad, S. Abu-Romman // *EurAsian Journal of Biosciences*. – 2020. – № 14 (2).

127. Hameed, A. Lactation responses toward milk indigenous enzymes / A. Hameed, M. Hussain, S. Akhtar // *Livestock Science: InTech*. – 2017. – № 2017. – P. 91-108.

128. Hazra, T. PCR based assay for the detection of cow milk adulteration in buffalo milk / T. Hazra, V. Sharma, R. Sharma [et al.] // Indian Journal of Animal Research. – 2018. – № 52 (3). – P. 383-387.
129. Hazra, T. Simplex PCR assay for detection of cow milk presence in goat milk / T. Hazra, V. Sharma, R. Sharma [et al.] // Indian Journal of Dairy Science. – 2016. – № 69 (5). – P. 621-625.
130. Huang, S. A rapid RPA-CRISPR/Cas12a detection method for adulteration of goat milk powder / S. Huang, Y. Liu, X. Zhang [et al.] // Foods. – 2023. – № 12 (8). – P. 1569.
131. Ilesanmi-Oyelere, B. L. The role of milk components, pro-, pre-, and synbiotic foods in calcium absorption and bone health maintenance / B. L. Ilesanmi-Oyelere, M. C. Kruger // Frontiers in Nutrition. – 2020. – № 7. – P. 578702.
132. Ionescu, A. D. A Review of Milk Frauds and Adulterations from a Technological Perspective / A. D. Ionescu, A. I. Cîrîc, M. Begea // Applied Sciences. – 2023. – № 13 (17). – P. 9821.
133. Ionescu, A. D. Technological frauds and milk adulterations: a review / A. D. Ionescu, A. I. Cîrîc, M. Begea // Scientific Papers. Series D. Animal Science. – 2023. – № 66 (2).
134. Jiang, Y. Temperature effects on calcium partition kinetics in pasteurised skim milk during storage / Y. Jiang, G. Barone, V. Rauh [et al.] // International Dairy Journal. – 2023. – № 137. – P. 105518.
135. Johnson, R. Food fraud and economically motivated adulteration of food and food ingredients / R. Johnson // Congressional Research Service. – 2014.
136. Jovanović, S. Whey proteins-properties and possibility of application / S. Jovanović, M. Barać, O. Maćej // Mljekarstvo. – 2005. – № 55 (3). – P. 215-233.
137. Jung, T. H. Hypoallergenic and Physicochemical Properties of the A2 β -Casein Fraction of Goat Milk / T. H. Jung, H. J. Hwang, S. S. Yun [et al.] // Korean journal for food science of animal resources. – 2017. – № 37 (6). – P. 940.

138. Kalogianni, D. P. DNA-based analytical methods for milk authentication / D. P. Kalogianni // *European Food Research and Technology*. – 2018. – № 244. – P. 775-793.
139. Kastanos, E. A simple and fast triplex-PCR for the identification of milk's animal origin in Halloumi cheese and yoghurt / E. Kastanos, C. Papaneophytou, T. Georgiou [et al.] // *Journal of Dairy Research*. – 2022. – № 89 (3). – P. 323-326.
140. Kent, W. J. The human genome browser at UCSC / W. J. Kent, C. W. Sugnet, T. S. Furey // *Genome research*. – 2002. – № 12 (6). – P. 996-1006.
141. Khan, I. T. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge / I. T. Khan, M. Nadeem, M. Imran [et al.] // *Lipids in health and disease*. – 2019. – № 18. – P. 1-13.
142. Khan, M. K. Food adulteration and its effect on health / M. K. Khan // *Community Based Medical Journal*. – 2013. – № 2 (2). – P. 1-3.
143. Khanafer, M. Knowledge, Attitudes and Practices of the Lebanese Community toward Food Adulteration / M. Khanafer, M. D. El Harake, I. Toufeili [et al.] // *Foods*. – 2022. – № 11 (20). – P. 3178.
144. Khanzadi, S. PCR-based detection of cow and goat milk in sheep milk and dairy products marketed in Mashhad city of Iran / S. Khanzadi, A. Jamshidi, J. Razmyar [et al.] // *Iranian Journal of Veterinary Medicine*. – 2013. – № 7 (4). – P. 257-62.
145. Kim, M. J. Direct duplex real-time loop mediated isothermal amplification assay for the simultaneous detection of cow and goat species origin of milk and yogurt products for field use / M. J. Kim, H. Y. Kim // *Food Chemistry*. – 2018. – № 246. – P. 26-31.
146. Klančnik, A. Robust PCR-based method for quantification of bovine milk in cheeses made from caprine and ovine milk / A. Klančnik, N. Toplak, M. Kovač [et al.] // *International Journal of Dairy Technology*. – 2016. – № 69 (4). – P. 540-549.
147. Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations / D. Klein // *Trends in molecular medicine*. – 2002. – № 8 (6). – P. 257-260.
148. Levi, R. Economically motivated adulteration in farming supply chains / R. Levi, S. Singhvi, Y. Zheng // *Management Science*. – 2020. – № 66 (1). – P. 209-226.

149. Li, B. Comparison of PCR Techniques in Adulteration Identification of Dairy Products / B. Li, M. Yu, W. Xu [et al.] // Agriculture. – 2023. – № 13 (7). – P. 1450.
150. Li, S. Seasonal variations in the composition and physicochemical characteristics of sheep and goat milks / S. Li, M. Delger, A. Dave [et al.] // Foods. – 2022. – № 11 (12). – P. 1737.
151. Liang, W. Detection of melamine adulteration in milk powder by using optical spectroscopy technologies in the last decade—a review / W. Liang, Y. Wei, M. Gao [et al.] // Food Analytical Methods. – 2020. – № 13. – P. 2059-2069.
152. Liao, J. Qualitative and quantitative identification of adulteration of milk powder using DNA extracted with a novel method / J. Liao, Y. F. Liu, T. Ku [et al.] // Journal of dairy science. – 2017. – № 100 (3). – P. 1657-1663.
153. Liu, B. Rapid detection of cow milk adulteration/contamination in goat milk by a lateral flow colloidal gold immunoassay strip / B. Liu, J. Si, F. Zhao [et al.] // Journal of Dairy Research. – 2019. – № 86 (1). – P. 94-97.
154. Lopez-Calleja, I. M. Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses / I. M. Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo [et al.] // International Dairy Journal. – 2007. – № 17 (1). – P. 87-93.
155. Lopez-Calleja, I. Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique / I. Lopez-Calleja, I. Gonzalez, V. Fajardo [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2004. – № 87 (9). – P. 2839-2845.
156. Lucena-Aguilar, G. DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis / G. Lucena-Aguilar, A. M. Sánchez-López, C. Barberán-Aceituno [et al.] // Biopreservation and biobanking. – 2016. – № 14 (4). – P. 264-270.
157. Mafra, I. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese / I. Mafra, Á. Roxo, I. M. Ferreira [et al.] // International Dairy Journal. – 2007. – № 17 (9). – P. 1132-1138.

158. Mafra, I. Animal species authentication in dairy products / I. Mafra, M. Honrado, J. S. Amaral // *Foods*. – 2022. – № 11 (8). – P. 1124.
159. Makena, M. R. Subtype specific targeting of calcium signaling in breast cancer / M. R. Makena, R. Rao // *Cell calcium*. – 2020. – № 85. – P. 102109.
160. Masci, M. Authenticity assessment of dairy products by capillary electrophoresis / M. Masci, C. Zoani, T. Nevigato [et al.] // *Electrophoresis*. – 2022. – № 43 (1-2). – P. 340-354.
161. Mašková, E. PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic / E. Mašková, I. Paulíčková // *Czech journal of food sciences*. – 2006. – № 24 (3). – P. 127.
162. Mattes, W. B. PCR: methods and limitations / W. B. Mattes, M. S. Miller // *Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Disease*. – 2000. – № 1. – P. 17-39.
163. Mayer, H. K. "A2 milk" authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques / H. K. Mayer, K. Lenz, E. M. Halbauer // *Food Research International*. – 2021. – № 147. – P. 110523.
164. Mazinani, M. Population, world production and quality of sheep and goat products / M. Mazinani, B. Rude // *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. – 2020. – № 15 (4). – P. 291-299.
165. Miller, B. A. Current status of global dairy goat production: An overview / B. A. Miller, C. D. Lu // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. – 2019. – № 32 (8 Suppl). – P. 1219.
166. Mininni, A. N. Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture / A. N. Mininni, C. Pellizzari, B. Cardazzo [et al.] // *International dairy journal*. – 2009. – № 19 (10). – P. 617-623.
167. Momtaz, M. Mechanisms and health aspects of food adulteration: A comprehensive review/ M. Momtaz, S. Y. Bubli, M. S. Khan // *Foods*. – 2023. – № 12 (1). – P. 199.

168. Nagraik, R. Milk adulterant detection: Conventional and biosensor based approaches: A review / R. Nagraik, A. Sharma, D. Kumar [et al.] // *Sensing and Bio-Sensing Research*. – 2021. – № 33. – P. 100433.
169. Nicholls, T. J. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA / T. J. Nicholls, M. Minczuk // *Experimental gerontology*. – 2014. – № 56. – P. 175-181.
170. Obladen, M. From swill milk to certified milk: progress in cow's milk quality in the 19th century / M. Obladen // *Annals of Nutrition and Metabolism*. – 2014. – № 64 (1). – P. 80-87.
171. Osman, A. A. Rapid detection of bovine-specific nucleic acid sequences in cow milk using polymerase chain reaction. *International Journal of Nutrition and Food Sciences* / A. A. Osman, A. M. Mahmoud, A. S. Soliman. – 2014. – № 3 (3). – P. 141-144.
172. Patari S. 3d paper-based milk adulteration detection device/ S. Patari, P. Datta, P. S. Mahapatra // *Scientific Reports*. – 2022. – № 12 (1). – P. 13657.
173. Pei, A. Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes / A. Pei, C. W. Nossa, P. Chokshi [et al.] // *PloS one*. – 2009. – № 4 (5). – P. e5437.
174. Pei, A. Y. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes / A. Y. Pei, W. E. Oberdorf, C. W. Nossa [et al.] // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – № 76 (12). – P. 3886-3897.
175. Piras, C. Rapid liquid AP-MALDI MS profiling of lipids and proteins from goat and sheep milk for speciation and colostrum analysis / C. Piras, C. Ceniti, E. Hartmane [et al.] // *Proteomes*. – 2020. – № 8 (3). – P. 20.
176. Poonia, A. Detection of adulteration in milk: A review / A. Poonia, A. Jha, R. Sharma [et al.] // *International journal of dairy technology*. – 2017. – № 70 (1). – P. 23-42.
177. Popescu, A. Trends in goats'livestock and goat milk, meat and cheese production in the world in the period 1990-2019-a statistical approach / A. Popescu, A. Marcuta, L. Marcuta [et al.] // *Scientific Papers: Management, Economic Engineering in Agriculture & Rural Development*. – 2021. – № 21 (1).

178. Potočnik, K. Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species / K. Potočnik, V. Gantner, K. Kuterovac [et al.] // *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*. – 2011. – № 61 (2). – P. 107-113.
179. Prajapati, D. B. Comparison of Surti goat milk with cow and buffalo milk for physicochemical characteristics, selected processing-related parameters and activity of selected enzymes / D. B. Prajapati, D. B. Kapadiya, A. K. Jain [et al.] // *Veterinary world*. – 2017. – № 10 (5). P. 477.
180. Prosser, C. G. Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula / C. G. Prosser // *Journal of food science*. – 2021. – № 86 (2). – P. 257-265.
181. Ramadan, H. A. I. Sequence of specific mitochondrial 16S rRNA gene fragment from Egyptian buffalo is used as a pattern for discrimination between river buffaloes, cattle, sheep and goats / H. A. I. Ramadan // *Molecular biology reports*. – 2011. – № 38. – P. 3929-3934.
182. Rasheed, S. Comparative study of cottage cheese prepared from various sources of milk / S. Rasheed, I. M. Qazi, I. Ahmed [et al.] // *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences*. – 2016. – № 53 (4). – P. 269-282.
183. Rentsch, J. Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese / J. Rentsch, S. Weibel, J. Ruf [et al.] // *European Food Research and Technology*. – 2013. – № 236 (1). – P. 217-227.
184. Ritota, M. Melamine detection in milk and dairy products: traditional analytical methods and recent developments / M. Ritota, P. Manzi // *Food analytical methods*. – 2018. – № 11. – P. 128-147.
185. Roy, D. Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species—A review / D. Roy, A. Ye, P. J. Moughan [et al.] // *Frontiers in Nutrition*. – 2020. – № 7. –P. 577759.
186. Rozhkova, A. V. Development of the dairy industry in the region / A. V. Rozhkova, J. A. Olentsova // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing. – 2020. – № 421 (2). – P. 022035.

187. Sakti, S. P. Development of QCM biosensor with specific cow milk protein antibody for candidate milk adulteration detection / S. P. Sakti, N. Chabibah, S. P. Ayu [et al.] // *Journal of Sensors*. – 2016. – № 2016 (1). – P. 1807647.
188. Sandulachi, E. Factors affecting quality of goat's milk yogurt / E. Sandulachi, V. Bulgaru // *Advances in social sciences research journal*. – 2019. – № 6 (2).
189. Sangthong, D. Multiplex PCR assay for species identification of meat and dairy products from buffalo (*Bubalus bubalis*), cattle (*Bos indicus* and *Bos taurus*), goat (*Capra hircus*), and sheep (*Ovis aries*) / D. Sangthong, S. Suwannarat, S. Samipak [et al.] // *International Food Research Journal*. – 2021. – № 28 (4.)
190. Sbisà, E. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications / E. Sbisà, F. Tanzariello, A. Reyes [et al.] // *Gene*. – 1997. – № 205 (1-2). – P. 125-140.
191. Scano, P. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk / P. Scano, A. Murgia, F. M. Pirisi // *Journal of dairy science*. – 2014. – № 97 (10). – P. 6057-6066.
192. Seçkin, A. K. Real-time PCR is a potential tool to determine the origin of milk used in cheese production / A. K. Seçkin, B. Yilmaz, H. Tosun // *Lwt*. – 2017. – № 77. – P. 332-336.
193. Sen, S. Potential of Fourier-transform infrared spectroscopy in adulteration detection and quality assessment in buffalo and goat milks / S. Sen, Z. Dundar, O. Uncu // *Microchemical Journal*. – 2021. – № 166. – P. 106207.
194. Sengupta, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique for Food Analysis / P. Sengupta, C. W. Wang, Z. F. Ma // *Techniques to Measure Food Safety and Quality: Microbial, Chemical, and Sensory*. – 2021. – P. 91-115.
195. Şensoy, T. A. Determination of Alpha S1-Casein, Beta-Lactoglobulin, Some Biochemical and Mineral Levels in Milk of Different Animals / T. A. Şensoy, G. Çiftci // *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. – 2022. – № 11 (1). – P. 28-36.

196. Şerbancea, F. Risk Factors in the Assessment of the Conformity of Falsified Dairy Products / F. Şerbancea, N. Belc, A. Stănescu // *Quality-access to success*. – 2018. – № 19 (163).
197. Taheri-Kafrani, A. Effects of heating and glycation of β -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients / A. Taheri-Kafrani, J. C. Gaudin, H. Rabesona [et al.] // *Journal of Agricultural and Food chemistry*. – 2009. – № 57 (11). – P. 4974-4982.
198. Thakur M. An Overview of Potential Toxicity of Food Adulterants and Food Adulteration Act / M. Thakur, K. D. Sharma, M. L. Verma // *Biotechnological Approaches in Food Adulterants*. – 2020. – P. 26-48.
199. Tibola, C. S. Economically motivated food fraud and adulteration in Brazil: Incidents and alternatives to minimize occurrence / C. S. Tibola, S. A. da Silva, A. A. Dossa, // *Journal of Food Science*. – 2018. – № 83 (8). – P. 2028-2038.
200. Tiwari, A. MeltDNA: Tool for prediction of DNA duplex hybridization and melting thermodynamics / A. Tiwari, V. Wadhwa // *Bioinformatics India*. – 2005. – № 1. – P. 35-43.
201. Tortorici, L. 12S rRNA mitochondrial gene as marker to trace Sicilian mono-species dairy products / L. Tortorici, R. Di Gerlando, M. Tolone [et al.] // *Livestock Science*. – 2016. – № 193. – P. 39-44
202. Tsakali, E. Milk adulteration: detection of bovine milk in caprine dairy products by real time PCR / E. Tsakali, C. Agkastra, C. Koliaki [et al.] // *Journal of Food Research*. – 2019. – № 8 (4). – P. 52-57.
203. Tsirigoti, E. Application of triplex-PCR with an innovative combination of 3 pairs of primers for the detection of milk's animal origin in cheese and yoghurt / E. Tsirigoti, Z. Katsirma, A. I. Papadopoulos [et al.] // *Journal of Dairy Research*. – 2020. – № 87 (2). – P. 239-242.
204. Tuncay, R. M. Comparison of PCR Methods for Determination of Different Types of Milk Added to Goat Milk / R. M. Tuncay, Y. C. Sancak // *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*. – 2022. – № 11 (3). – P. 509-514.

205. Tuncay, R. M. Detection of adulteration of goat milk sold in the Turkish / R. M. Tuncay. – 2023.
206. Vafin, R. R. Species identification of ruminant milk by genotyping of the κ -casein gene / R. R. Vafin, A. G. Galstyan, S. V. Tyulkin [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2022. – № 105 (2). – P. 1004-1013.
207. Von Ahsen, N. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg^{2+} , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas / N. Von Ahsen, C. T. Wittwer, E. Schutz // Clinical Chemistry. – 2001. – № 47 (11). – P. 1956-1961.
208. Vujadinović, D. Comparison of methods for determining the falsification of milk / D. Vujadinović, M. Beribaka, M. Vukić [et al.] // Journal of Hygienic Engineering and Design. – 2017. – № 18. – P. 19-24.
209. Wang, Y. A high sensitivity method of closed-tube loop-mediated isothermal amplification developed for visual and rapid detection of cow milk adulteration / Y. Wang, Z. Yu, Y. Liu // International Dairy Journal. – 2022. – № 127. – P. 105214.
210. Wang, Z. Determination of content of camel milk in adulterated milk samples by normalized real-time polymerase chain reaction system based on single-copy nuclear genes / Z. Wang, T. Li, W. Yu [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2020. – № 100 (8). – P. 3465-3470.
211. Wen, Y. A Dual and Rapid RPA-CRISPR/Cas12a Method for Simultaneous Detection of Cattle-Derived and Soybean-Derived Adulteration in Goat Milk Powder / Y. Wen, S. Huang, H. Lei [et al.] // Foods – 2024. – № 13 (11). – P. 1637.
212. Wu, X. Detection of Ovine or Bovine Milk Components in Commercial Camel Milk Powder Using a PCR-Based Method / X. Wu, Q. Na, S. Hao [et al.] // Molecules. – 2022. – № 27 (9). – P. 3017.
213. Wu, X. Reducing the allergenic capacity of β -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols / X. Wu, Y. Lu, H. Xu [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – № 256. – P. 427-434.

214. Yaman H. A rapid method for detection adulteration in goat milk by using vibrational spectroscopy in combination with chemometric methods / H. Yaman // *Journal of Food Science and Technology*. – 2020. – № 57 (8). – P. 3091-3098.
215. Yan, L. Exploring genetic diversity and phylogenetic relationships of Chinese cattle using gene mtDNA 16S rRNA / L. Yan, Y. She, M. A. Elzo [et al.] // *Archives animal breeding*. – 2019. – № 62 (1). – P. 325-333.
216. Yang, B. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis / B. Yang, Y. Wang, P. Y. Qian // *BMC bioinformatics*. – 2016. – № 17. – P. 1-8.
217. Ye, J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya [et al.] // *BMC bioinformatics*. – 2012. – № 13. – P. 1-11.
218. Yu, W. Multiple authentications of high-value milk by centrifugal microfluidic chip-based real-time fluorescent LAMP / W. Yu, Y. Chen, Z. Wang [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – № 351. – P. 129348.
219. Zachar, P. Analytical methods for the species identification of milk and milk products / P. Zachar, M. Šoltés, R. Kasarda [et al.] // *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*. – 2011. – № 61 (3). – P. 199-207.
220. Zajác, P. Detection of adulteration of traditional Slovak bryndza ewe's cheese with cow's lump cheese by isoelectric focusing of gamma caseins / P. Zajác, E. Beňová, R. Židek [et al.] // *International Journal of Food Properties*. – 2021. – № 24 (1). – P. 1034-1060.
221. Zhang, X. DNA-based qualitative and quantitative identification of bovine whey powder in goat dairy products / X. Zhang, C. Qiao, S. Fu [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2022. – № 105 (6). – P. 4749-4759.
222. Zhou C. Rapid authentication of characteristic milk powders by recombinase polymerase amplification assays / C. Zhou, L. Liu, J. Chen [et al.] // *Food Chemistry*. – 2024. – № 443. – P. 138540.

ПРИЛОЖЕНИЕ А – Стандарт организации

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
(ФГАНУ ВНИМИ)

**СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ**

**СТО
00419785-083-2025**



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГАНУ ВНИМИ

А. Г. Галстян

2025 г.

**Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения
ДНК BOS TAURUS в сырье и готовой продукции с использованием
технологии TaqMan**

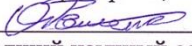
РАЗРАБОТАНО:

ФГАНУ ВНИМИ

лаборатория прикладной микробиологии

и геномики микроорганизмов

зав. лабораторией, к.б.н.

 О.Ю. Фоменко

младший научный сотрудник

 А.В. Хан

Москва
2025

ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Акты апробации

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ») ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ «МОЛОКО»
Аттестат аккредитации RA.RU.21ПЩ98

115093, Москва, ул. Люсиновская, 35 корп. 7 Тел: +7 499 236 44 81, e-mail:
ilmoloko@mail.ru www.molokolab.ru

АКТ

Апробации и внедрении методики выполнения измерений по выявлению и
количественному определению ДНК *Bos taurus*

Мы, нижеподписавшиеся: заведующая лабораторией испытательной лабораторией «Молоко» (ФГАНУ «ВНИМИ»), к.т.н. Юрова Е.А., научный сотрудник, к.т.н. Жижин Н.А., младший научный сотрудник Хан А.В., старший научный сотрудник Фоменко О.Ю. составили настоящий акт о том, что на базе испытательной лаборатории «Молоко» проведена апробация и внедрение методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах.

Методика основана на выявлении ДНК крупного рогатого скота с одновременным количественным определением суммарной ДНК домашнего быка в диапазоне измерений от 0,001 до 10 нг на реакцию включительно. Разработанная методика предусматривает применение тест-системы, в состав которой входят реакционные смеси и набор положительных контролей для построения стандартной кривой при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени. Проведены исследования образцов молока и молочных продуктов, отобранных в соответствии с СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan». В результате апробации методики выполнения измерений показатели сходимости и воспроизводимости результатов исследований не превышали значения коэффициента вариации пороговых циклов 5% и 10% соответственно, что указывает на корректность данных, полученных при использовании данной тест-системы.

Применение разработанной методики позволяет расширить область оценочных критериев безопасности козьего молока и продуктов его переработки, что позволит проводить мониторинг продуктов на наличие ДНК *Bos taurus*.

Е.А. Юрова

Н.А. Жижин

А.В. Хан

О.Ю. Фоменко





РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ»
(ФГБУ «ВГНКИ»)**

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5
тел.: (495) 982-50-84, факс (499) 253-14-91
ИНН 7703056867, КПП 770301001
E.mail: vgnki@fsvps.gov.ru
<http://vgnki.ru>

№ _____
на _____ от _____.

Справка апробации и внедрении методики выполнения измерений по количественному определению ДНК крупного рогатого скота в молоке и молочных продуктах.

Настоящим письмом ФГБУ «ВГНКИ» подтверждает, что на базе отдела по контролю ГМО проведена апробация и внедрение методики выполнения измерений по количественному определению ДНК крупного рогатого скота в молоке и молочной продукции.

Методика основана на выявлении ДНК *Bos taurus* с одновременным количественным определением количества суммарной ДНК домашнего быка. Диапазон измерений составляет от 0,001 до 10 нг суммарной ДНК на реакцию включительно.

Данная методика предполагает использование молекулярно-генетической тест-системы с набором реагентов положительных и отрицательных контролей и реакционных смесей для построения стандартной калибровочной кривой при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Проведены исследования образцов молока и молочных продуктов. Процедуры отбора проб и последующее выделение ДНК проводились согласно

Данная методика позволяет количественно определить содержание суммарной ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах для обеспечения контроля их качества и безопасности.

А.В. Третьяков

АКТ

Апробации и внедрении методики выполнения измерений по выявлению и количественному определению ДНК крупного рогатого скота в молоке и молочных продуктах

Мы, нижеподписавшиеся: младший научный сотрудник научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН Калугина З.И., заведующий сектором аналитических методов исследования научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН Глазков С.В., младший научный сотрудник лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» Хан А.В., к.б.н., старший научный сотрудник, заведующий лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» Фоменко О.Ю. составили настоящий акт о том, что на базе сектора аналитических методов исследования научно-исследовательского испытательного центра ВНИИТеК – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН проведена апробация и внедрение методики выполнения измерений по идентификации ДНК крупного рогатого скота в молоке и молочной продукции.

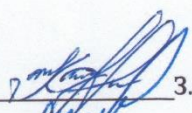

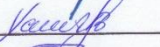
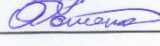
Методика выполнения измерений основана на определении суммарной ДНК крупного рогатого скота с одновременным количественным определением в диапазоне измерений от 0,001 до 10 нг на реакцию включительно.

Проведены исследования образцов молока и молочных продуктов, отобранных в соответствии с СТО 00419785-083-2025 «Молоко и молочные продукты. Количественный метод обнаружения ДНК *Bos taurus* в сырье и готовой продукции с использованием технологии TaqMan».

Оценка полученных результатов исследования показала, что показатели сходимости и воспроизводимости результатов, полученных с применением разработанной тест-системы, не превышали значения коэффициента вариации пороговых циклов 5% и 10% соответственно.

Разработанная методика позволяет количественно оценить содержание ДНК *Bos taurus* в молоке и молочных продуктах, что позволяет расширить область критериев контроля качества и безопасности козьего молока и молочной продукции



 З. И. Калугина
 С.В. Глазков
 А.В. Хан
 О.Ю. Фоменко

ПРИЛОЖЕНИЕ В – Дипломы





