

Оптимизация молекулярно-генетического метода идентификации молочного сырья

А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: В данной статье рассматривается актуальная проблема обеспечения качества и безопасности молочных продуктов путем борьбы с фальсификацией. В данном исследовании рассматривается проблема видовой фальсификации, в частности замена козьего молока коровьим из-за значительной разницы в стоимости. Разработка и внедрение новых средств обнаружения и идентификации такого рода фальсификации имеет решающее значение, так как применяющиеся традиционные методы, такие как электрофорез и хроматография, зачастую являются дорогостоящими и трудоемкими. В статье рассматривается использование молекулярно-генетических методов, в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР), как более эффективного и точного средства выявления видовой фальсификации молока. Такие методы, как ПЦР, обладают высокой специфичностью, чувствительностью, скоростью и возможностью проведения количественного и мультиплексного анализа.

Цель: оптимизация метода идентификации видовой принадлежности сырого молока при помощи ПЦР-скрининга с использованием маркеров ядерной ДНК.

Материалы и методы: Исследование, выполненное в Центральной лаборатории микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности, посвящено видовой идентификации молока крупного и мелкого рогатого скота с использованием специфического набора праймеров, комплементарных консервативному участку гена амилогенина жвачных. Исследование включает в себя выделение суммарной ДНК из образцов сырого молока сельскохозяйственных животных с последующим ПЦР-скринингом и детекцией результатов по конечной точке.

ПЦР-анализ проводили в реакционных смесях объемом 25 мкл, включающих такие ключевые компоненты, как смесь 5xScreen Mix, специфические праймеры, образцы ДНК и не содержащую нуклеазы деионизированную воду. Программа амплификации включала этапы денатурации, отжига и элонгации в течение нескольких циклов.

Результаты: Эксперимент был направлен на оценку пригодности праймеров SE47 и SE48 для амплификации ядерной ДНК соматических клеток молока крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и коз (*Capra hircus*). Первоначально при проведении ПЦР-реакции использовалась расчётная температура отжига 56 °С, однако использование данного режима приводило к появлению многочисленных неспецифических ПЦР-продуктов, выявляемых на электрофореграмме. Для решения данной проблемы мы поэтапно повышали температуру отжига, что привело к значительному снижению синтеза неспецифических ампликонов и, в конечном итоге, достижению 100 % специфичности амплификации при температуре отжига 70 °С.

Выводы: Нам удалось оптимизировать систему детекции на основе ПЦР для определения видовой идентификации молока крупного и мелкого рогатого скота. Полученные результаты подтверждают возможность использования геномной ДНК соматических клеток молока для успешной амплификации видоспецифических ядерных маркеров, но сохраняется необходимость проведения дальнейших исследований для определения чувствительности ПЦР-системы и возможности её применения при анализе продуктов переработки молока.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция; видовая идентификация молока; фальсификация молока

Корреспонденция:

Екатерина Германовна

Лазарева,

E-mail: e_lazareva@vnimi.org

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 03.06.2023

Принята: 15.12.2023

Опубликована: 30.12.2023

Copyright: © 2023 Авторы



Для цитирования: Хан, А.В., Лазарева, Е.Г., & Фоменко, О.Ю. (2023). Оптимизация молекулярно-генетического метода идентификации молочного сырья. FOOD METAENGINEERING, 1(4), 39-47. <https://doi.org/10.37442/fme.2023.4.29>

Optimization of Molecular Genetic Method for Identification of Dairy Raw Materials

Alexei V. Khan, Ekaterina G. Lazareva, Oleg Yu. Fomenko

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: This article addresses the pressing issue of ensuring the quality and safety of dairy products by combating adulteration, a challenge that continues to plague the dairy industry. Adulteration, often driven by cost-cutting motives, involves altering the composition, quality, or origin of dairy products, even in the face of tightened control measures and improved monitoring systems. Specifically, this study hones in on the problem of species-specific adulteration, particularly the substitution of goat milk with cow milk due to the significant cost differential. Detecting and identifying such adulteration is crucial, and while traditional methods like electrophoresis and chromatography have been used, they are often expensive and labor-intensive. The article explores the use of molecular genetic methods, particularly polymerase chain reaction (PCR), as a more efficient and accurate means of identifying species-specific milk adulteration. Methods like PCR offer high specificity, sensitivity, speed, and the ability to perform quantitative and multiplex analyses.

Purpose: To optimise a method for species identification of dairy products by PCR-based screening using DNA isolated from cow's and goat's milk somatic cells.

Materials and Methods: This research conducted at the Central Laboratory of Microbiology, All-Russian Research Institute of Dairy Industry, focuses on milk species identification of cattle and small ruminants using a specific set of primers targeting the polymorphic amylogenin gene. The study involves PCR screening with DNA extracted from cow's and goat's raw milk utilizing a MiniAmp instrument for the analysis. Qualitative and quantitative assessments of DNA preparations were performed, measuring DNA concentration with a Qubit 4 fluorimeter and Qubit dsDNA BR Assay Kit. PCR analysis was carried out in 25 µl reactions, including key components such as 5xScreen Mix, specific primers, DNA samples, and mQ H₂O. The amplification program comprised denaturation, annealing, and elongation steps over a series of cycles.

Results: The experiment was aimed at assessing the suitability of primers SE47 and SE48 for amplification of nuclear DNA of milk somatic cells of cattle (*Bos taurus*) and goats (*Capra hircus*). Initially, a calculated annealing temperature of 56 °C was used in the PCR reaction, yielding in numerous nonspecific fragments appeared on the electropherogram. To solve this problem, we gradually increased the annealing temperature, which resulted in a significant decrease in the nonspecific fragments number and their complete absence at annealing temperature of 70 °C.

Conclusion: We succeeded in optimizing a PCR-based detection system for the milk species identification of cattle and small ruminants. The results obtained confirm the possibility of using genomic DNA of milk somatic cells for the successful amplification of species-specific nuclear markers, but there remains a need for further research to determine the sensitivity of the PCR system and the possibility of its use in the analysis of milk processing products.

Keywords: polymerase chain reaction; milk species identification; milk adulteration

Correspondence:

Ekaterina G. Lazareva,
E-mail: e_lazareva@vniimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 03.06.2023

Accepted: 15.12.2023

Published: 30.12.2023

Copyright: © 2023 The Authors



ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение качества и безопасности молочных продуктов путем выявления фальсификации является важной задачей в молочной промышленности (Хуршудян и др., 2022; Макеева и др., 2021). Многие производители прибегают к намеренному изменению состава, качества или происхождения молочных продуктов с целью снижения себестоимости (Smith-Howard, 2017; Rodionov et al., 2021). Несмотря на то, что меры контроля с каждым годом ужесточаются и система мониторинга совершенствуется, данные мероприятия не всегда способны предотвращать появление на прилавках продуктов ненадлежащего качества (Mafra et al., 2022; Chen et al., 2017). В свете вышеописанных факторов оптимизация методов контроля молока и продуктов его переработки является актуальной в современной сельскохозяйственной практике (Юрова и др., 2021).

В рамках данной работы мы сфокусируемся на проблеме видовой фальсификации молока — теме, которая привлекает всё большее внимание в связи с ее экономическими и медицинскими последствиями. Наиболее распространенным типом видовой фальсификации является частичная замена козьего молока коровьим (Канина и др., 2021; Roy et al., 2020). Данный процесс с финансовой точки зрения связан с более низкой себестоимостью коровьего молока (~35 руб./л) относительно козьего (~75 руб./л). С точки зрения безопасности данный вид фальсификации негативно влияет на следующие аспекты: возможные аллергические реакции на избыточное содержание α -1 казеина в коровьем молоке, а также отрицательного воздействия β -казеина типа A1 (Miciński et al., 2013; Jianqin et al., 2015; Rahmatalla et al., 2022), ухудшение усвояемости по причине крупных жировых глобул и негативного эффекта от высокого содержания лактозы (Schmidt et al., 2020; Prosser et al., 2021).

Для решения проблемы видовой фальсификации молока важно внедрить эффективные методы выявления такого рода фальсификации (Poonia et al., 2017; Banti, 2020; Choudhary et al., 2020). Традиционно для этих целей используются электрофоретический и хроматографический методы, зачастую являющиеся дорогостоящими и трудоемкими (Nascimento et al., 2017). Например, в работе Trimboli et al. (2019) рассматривается использование метода капиллярного электрофореза (КЭ) для выявления примеси коровьего молока в молоке буйво-

лиц с использованием в качестве маркера фальсификации одного из белков коровьего молока. Данный метод характеризуется простотой анализа, эффективностью, пониженной частотой ошибок и хорошей прогностической точностью, подтвержденной статистическими результатами, что достигается за счёт применения единого алгоритма анализа. Однако совершенствование аналитических методик и статистических методов открыло путь к более эффективному и точному выявлению видовой фальсификации молока.

Например, в работе Chen et al. (2004) рассматривается разработка аналитического метода количественного определения уровня фальсификации козьего молока коровьим с помощью ВЭЖХ/ЭСИ-МС. Исследование посвящено выделению и идентификации сывороточных белков из образцов козьего и коровьего молока. Результаты показывают, что предложенный метод позволяет точно количественно определять наличие коровьего молока в козьем молоке даже при низком уровне фальсификации.

Существующие методы выявления фальсификации молока часто ограничены в своей способности улавливать тонкие различия между молоком из разных источников животного происхождения. Такие недостатки приводят к неполному обнаружению и вызывают вопросы о подлинности молочных продуктов на рынке. Поэтому очевидна необходимость оптимизации молекулярно-генетических методов идентификации видовой принадлежности молочной продукции с целью повышения эффективности и точности выявления фальсификации пищевых продуктов. Мы считаем, что наиболее оптимальным методом выявления видовой принадлежности является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Методы на основе ДНК обладают высокой специфичностью, чувствительностью, скоростью и возможностью проведения количественных и мультиплексных анализов, что делает их ценным инструментом для целей аутентификации пищевых продуктов (Юрова и др., 2020; Fekete et al., 2017; Baptista et al., 2021). В данном исследовании для решения этих проблем предлагается инновационный подход, использующий ПЦР-анализ для устранения существующих недостатков в выявлении фальсификации молока.

А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследований являлось сырое коровье и козье молоко, использовавшиеся для выделения суммарной ДНК.

Оборудование

ПЦР-скрининг проводился посредством амплификации на приборе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США). Для анализа полученных результатов использовали системы гель-документирования «Vilber E-Box-CX5.TS» (Vilber, Франция), оснащённую трансиллюминатором «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

Методы

В рамках данной работы исследования проводились с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) — метода молекулярной биологии, основанного на избирательной амплификации молекул-мишеней. ПЦР позволяет легко проводить различные манипуляции с нуклеиновыми кислотами. Для последующего анализа и интерпретации данных применялся электрофорез в агарозном геле, обеспечивающий разделение целевых амплифицированных молекул по размеру и обнаруживает необходимые различия в видоспецифичной ПЦР.

Процедура исследования

Для выделения ДНК использовали осадок соматических клеток, полученный из 2 мл анализируемых образцов молока. Для выделения использовали коммерчески доступные наборы «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно рекомендациям производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили в конечном объеме 25 мкл. Для специфической амплификации фрагмента генов AMELX жвачных использовались праймеры 5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGC-3' (SE47, прямой) и 5'-CCCGCTTGGCTTGTCTGTTGC-3' (SE48, обратный) согласно Ennis & Gallagher (1994). Реакционная смесь состояла из 5 мкл 5xScreen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл праймера SE47 10 мМ, 1 мкл праймера SE48 10 мМ, 2 мкл образца ДНК и 16 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз.

Программа для амплификации включала первоначальную денатурацию при 95 °С в течение 5 минут, серию из 35

циклов, где каждый цикл включал 3 стадии: денатурацию при 95 °С 15 секунд, отжиг с вариативной температурой 15 секунд и элонгацию при 72 °С 20 секунд, и наконец финальную элонгацию при 72 °С в течение 10 минут.

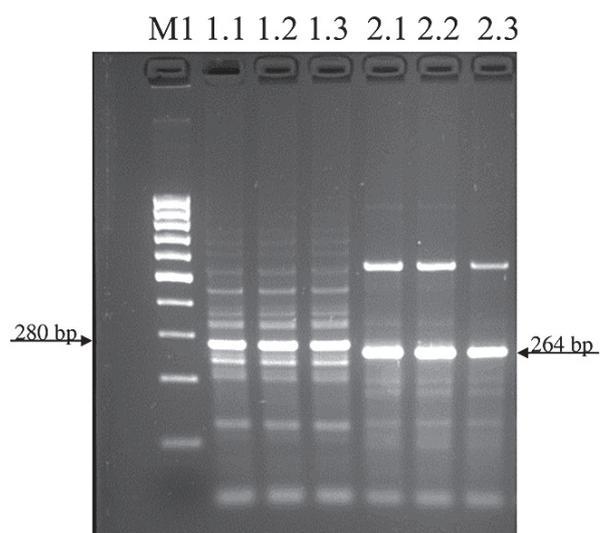
Электрофорез для оценки идентификации видовой принадлежности ДНК проводили в 2,5% агарозном геле (VWR International LLC, США) при напряжении электрического поля 7 В/см геля, где в качестве стандартных маркеров длин ДНК были использованы «100+ bp DNA Ladder» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Для детекции амплифицированных фрагментов гели были приготовлены с добавлением раствора бромистого этидия.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе мы проводили ПЦР с ДНК сельскохозяйственных животных (КРС, козы) при температуре отжига равной 56 °С. Данное значение было получено теоретически путём анализа термодинамических характеристик олигонуклеотидов с использованием сервиса «NEB Tm Calculator» (<https://tmcalsculator.neb.com/#!/main>). Последующий анализ электрофореграммы выявил значительный уровень неспецифической амплификации в виде множественных дополнительных бэндов побочных ПЦР-фрагментов во всех исследуемых образцах (Рисунок 1).

Рисунок 1

Электрофореграмма ПЦР при $T_a = 56^\circ\text{C}$.



Примечание: M1 — маркер («100+ bp DNA Ladder»); 1.1, 1.2, 1.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина КРС; 2.1, 2.2, 2.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина козы.

А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко

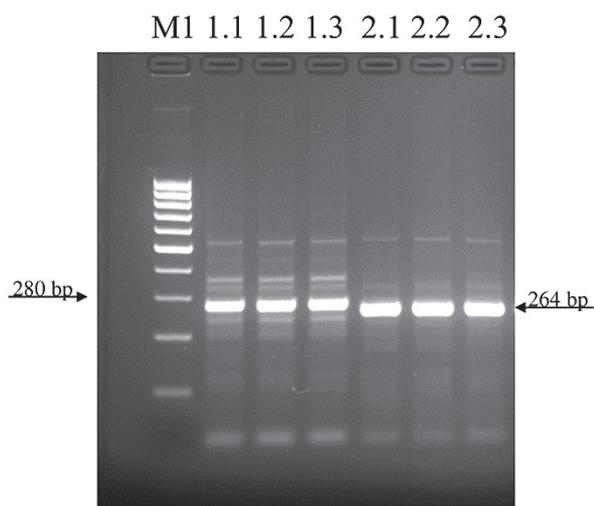
На следующем этапе нашей работы было принято решение провести серию ПЦР при более высоких температурах отжига для повышения точности ПЦР-амплификации. При повышении температуры до 62 °С видно уменьшение выхода высокомолекулярных продуктов неспецифической амплификации. Полосы, соответствующие целевым ампликонам, стали более различимы по сравнению с исходными условиями термоциклирования (Рисунок 2).

Последующее повышение температуры отжига олигонуклеотидных затравок приводило к дальнейшему росту специфичности амплификации целевых фрагментов гена AMELX. Анализ электрофореграмм показал увеличение выхода целевых ампликонов при проведении ПЦР, и существенное снижение эффективности амплификации неспецифических продуктов реакции, в особенности — низкомолекулярных в диапазоне длин 100–250 пар оснований (Рисунок 3).

Сдвиг температуры отжига праймеров в область оптимума активности Taq-полимеразы ($T_a = 70\text{ }^\circ\text{C}$) привел к полному исчезновению продуктов неспецифической амплификации и обнаружению на электрофореграмме исключительно ампликонов целевой длины: 280 пар оснований в случае коровьего молока, и 264 пар — в случае козьего (Рисунок 4). Проведение ПЦР при дан-

Рисунок 2

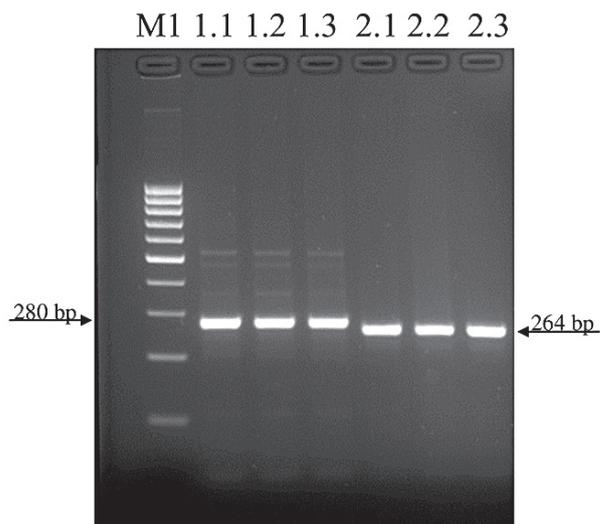
Электрофореграмма ПЦР при $T_a = 62\text{ }^\circ\text{C}$.



Примечание: M1 — маркер («100+ bp DNA Ladder»); 1.1, 1.2, 1.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина КРС; 2.1, 2.2, 2.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина козы;

Рисунок 3

Электрофореграмма ПЦР при $T_a = 68\text{ }^\circ\text{C}$.

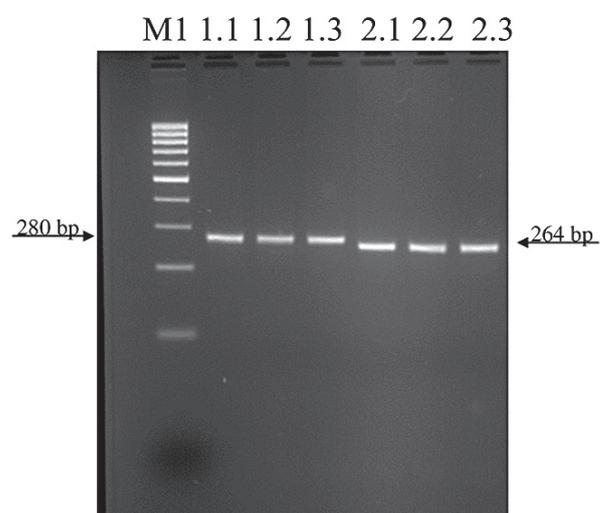


Примечание: M1 — маркер («100+ bp DNA Ladder»); 1.1, 1.2, 1.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина КРС; 2.1, 2.2, 2.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина козы;

ных условиях позволило, таким образом, визуально отличать ПЦР-продукты, полученные с использованием ДНК сырого молока коров, от амплифицированных фрагментов гена AMELX коз.

Рисунок 4

Электрофореграмма ПЦР при $T_a = 70\text{ }^\circ\text{C}$.



Примечание: M1 — маркер («100+ bp DNA Ladder»); 1.1, 1.2, 1.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина КРС; 2.1, 2.2, 2.3 — ПЦР-фрагменты амилогенина козы;

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для аутентификации пищевых продуктов широко используются методы, основанные на ПЦР, которые предполагают применение электрофореза и гибридизационно-флуоресцентных методов детекции для анализа продуктов амплификации. На данный момент разработаны различные подходы, включая методы ПЦР-ПДРФ (полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов), а также гибридизации, секвенирования и биосенсорного анализа на основе последовательностей митохондриальных и ядерных генов.

В исследовании Вафина и соавт. (2022) для определения видовой специфичности ДНК молока был использован комплексный метод ПЦР-ПДРФ. Данный подход позволил определить и аутентифицировать коровье, козье и овечье молоко, а также соответствующие молочные продукты, используя в качестве ДНК-маркера ген *k*-казеина. Однако проведение ПЦР с последующим рестрикционным анализом представляет собой очень продолжительный по времени процесс, обладающий большой трудоёмкостью, требующий использования дорогостоящих реактивов и несущий повышенный риск контаминации образцов и лаборатории.

Также в исследованиях по видовой аутентификации часто используется ПЦР-идентификация по митохондриальной ДНК. В одном из исследований, проведенном Maudet et al. (2001), использовалась стандартная технология ПЦР с использованием контрольного участка митохондриальной ДНК коровы, что позволило успешно обнаружить ДНК коровьего молока в козьем сыре с высоким уровнем чувствительности, выявляя количество до 0,1 %. Аналогичным образом, в другой научной публикации Pinto et al. (2004) использовали стандартную технологию ПЦР для амплификации коровьего митохондриального гена цитохрома *b* и успешно выявили молочные компоненты в 30 итальянских сырах из молока буйволиц.

Нами была предпринята попытка выяснить возможность использования маркеров ядерной ДНК для определения видовой принадлежности молока. В качестве мишени нами был выбран ген, кодирующий белок амилогенин — один из ключевых компонентов зубной эмали (Ali & Farooq, 2019). Благодаря различной длине аллелей, расположенных на различных половых хромосомах, амплификация фрагментов данного гена широко используется в судебно-медицинской прак-

тике и при проведении антропологических исследований для установления пола (Masuyama et al., 2017). В животноводстве известна успешная попытка создания универсальной тест-системы для определения пола у представителей семейства полорогих (Петров и др., 2018). Однако до настоящего времени не предпринималось попыток использования данного маркера для определения видовой принадлежности сырого молока. Поэтому нами была изучена возможность амплификации фрагментов генов AMELX с использованием ДНК соматических клеток молока.

На первом этапе была произведена проверка пригодности праймеров для работы с геномной ДНК соматических клеток молока КРС (*Bos taurus*) и козы (*Capra hircus*). За отправную точку в оптимизации режима термоциклирования при проведении ПЦР нами была выбрана расчётная температура отжига олигонуклеотидов (T_d), равная 56 °С. Однако, как показала аналитическая электрофорез в агарозном геле, амплификация в данных условиях приводила к синтезу значительного количества неспецифических продуктов с размерами как больше, так и меньше длины целевых фрагментов (280 п.о. для коровы и 264 п.о. — для козы). Один из праймеров, используемых для исключения образования неспецифических ампликонов, размер которых не соответствует полученному при моделировании результатов полимеразной цепной реакции *in silico*, является повышение температуры отжига. При этом необходимо учитывать, что оптимальная температура отжигов праймеров, в отличие от температуры их плавления (T_m), определяется не только их первичной структурой, но и характеристиками реакционной смеси, а также может в значительной степени зависеть от стоящих перед исследователем задач. Поэтому теоретическое определение данного параметра представляет собой довольно нетривиальную задачу, решение которой требует знания точного состава буфера для ПЦР. Например, осуществления вычислений с использованием программного обеспечения Primer3, требует использования информации о концентрации моно- и дивалентных катионов, содержании свободных дезоксирибонуклеотидтрифосфатов в реакционной смеси, и даже о концентрации олигонуклеотидов, отжигающихся на матрице, которая, в свою очередь, зависит от количества ДНК (включая образующийся в ходе реакции ПЦР-продукт) в пробирке в течение конкретного цикла реакции (Untergasser et al., 2012). Однако в ряде случаев (например, при использовании готовых коммерческих

ПЦР-смесей) данная информация может быть полностью или частично недоступна. Поэтому в большинстве ситуаций существует необходимость подбора оптимального значения температуры отжига для достижения наилучшей чувствительности и эффективности ПЦР-системы с учётом применяемого оборудования и реагентов. Поэтапное повышение температуры отжига праймеров sp47 и sp48 при использовании их для амплификации целевого фрагмента гена AMELX привело к значительному снижению выхода неспецифических продуктов и полному их отсутствию при достижении T_a уровня 70°C. Данное значение лежит в пределах температурного оптимума термостабильной полимеразы Taq (Каледин и др., 1980; Lawyer et al., 1993), что позволяет в дальнейшем провести исследования, направленные на существенное уменьшение времени проведения анализа.

ВЫВОДЫ

В заключение следует отметить, что обеспечение качества и безопасности молочной продукции представляет собой актуальную проблему для отрасли, связанную в первую очередь с фальсификацией, обусловленной финансовыми соображениями. Несмотря на усиление мер регулирования, наличие на рынке продукции, не отвечающей установленным требованиям, подчеркивает необходимость усиления контроля качества. В данной работе рассматривается проблема фальсификации молока по видовому признаку с особым акцентом на рас-

пространенном явлении замены козьего молока на коровье. Такая замена влечет за собой экономические последствия и проблемы безопасности, в частности, возможное возникновение аллергических реакций и осложнений пищеварения.

Нам удалось оптимизировать систему праймеров, использующуюся в целях определения пола сельскохозяйственных животных, для осуществления видовой идентификации сырого молока крупного и мелкого скота на основе ПЦР. Полученные результаты подтверждают возможность использования геномной ДНК соматических клеток молока для успешной амплификации видоспецифических ядерных маркеров, но сохраняется необходимость проведения дальнейших исследований для определения чувствительности ПЦР-системы и возможности её применения при анализе продуктов переработки молока.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Хан Алексей Владимирович: методология и обработка данных; создание рукописи; утверждение окончательного варианта статьи.

Лазарева Екатерина Германовна: общее руководство и дизайн исследования; создание рукописи; утверждение окончательного варианта статьи.

Фоменко Олег Юрьевич: создание рукописи; редактирование; утверждение окончательного варианта статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каледин, А.С., Слюсаренко, А.Г., Городецкий, С.И. (1980). Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* YТ1. *Биохимия*, 45(4), 644–651.
- Kaledin, A.S., Slyusarenko, A.G., Gorodetsky, S.I. (1980). Isolation and properties of DNA polymerase from the extremophilic thermophilic bacterium *Thermus aquaticus* YТ1. *Biochemistry*, 45(4), 644–651. (In Russ.)
- Канина, К. А., & Жижин, Н. А. (2021). Изучение качества козьего молока и овечьего как сырья для производства молочных продуктов, 3-46, 238.
- Kanina, K. A., Zhizhin, N. A. (2021). Study of the quality of goat and sheep milk as raw material for the production of dairy products, Z-46, 238. (In Russ.)
- Макеева, И. А., Стратонова, Н. В., Пряничникова, Н. С., & Белякова, З. Ю. (2021). Российские молочные продукты: эволюция идентификации. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*, (2–3), 10–13. <https://doi.org/10.26297/0579-3009.2021.2-3.2>
- Makeeva, I. A., Stratonova, N. V., Pryanichnikova, N. S., & Belyakova, Z. Yu. (2021). Russian dairy products: The evolution of identification. *News of Higher Educational Institutions. Food Technology*, (2–3), 10–13. (In Russ.) <https://doi.org/10.26297/0579-3009.2021.2-3.2>
- Петров, С. Н., Харзинова, В. Р., Костюнина, О. В., Доцев, А. В., & Зиновьева, Н. А. (2018). Разработка универсальной тест-системы для определения пола у видов семейства полорогих на основе анализа полиморфизма гена

- амелогенина. Генетика и разведение животных, (4), 3–9. <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2018-4-3-9>
- Petrov, S. N., Kharzinova, V. R., Kostyunina, O. V., Dotsev, A. V., & Zinovieva, N. A. (2018). Development of a universal test system for determining the sex of Bovidae family species based on the analysis of amelogenin gene polymorphism. *Genetics and Animal Breeding*, (4), 3–9. (In Russ.) <https://doi.org/10.31043/2410-2733-2018-4-3-9>
- Хуршудян, С. А., Пряничникова, Н. С., & Рябова, А. Е. (2022). Качество и безопасность пищевых продуктов. Трансформация понятий. *Пищевая промышленность*, (3), 8.
- Khurshudyan, S. A., Pryanichnikova, N. S., & Ryabova, A. E. (2022). Quality and safety of food products. Transformation of concepts. *Food Industry*, (3), 8. (In Russ.)
- Юрова, Е. А., Фильчакова, С. А. (2021). Разработка методик измерений, обеспечивающих проведение испытаний продукции по всему спектру показателей и идентификационных характеристик продукта. Идеи академика Владимира Дмитриевича Харитонов в наукоемких технологиях переработки молока (с. 243–262). Москва: ВНИМИ.
- Yurova, E. A., Filchakova, S. A. (2021). Development of measurement methods ensuring the testing of products across the entire spectrum of indicators and product identification characteristics. Ideas of Academician Vladimir Dmitrievich Kharitonov in science-intensive milk processing technologies (с. 243–262). Москва: ВНИМИ. (In Russ.)
- Юрова, Е. А., Фильчакова, С. А., & Жижин, Н. А. (2020). Применение метода ПЦР-анализа для определения видового состава молочного сырья. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*, (6), 16–25. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-6-16-25>
- Yurova, E. A., Filchakova, S. A., & Zhizhin, N. A. (2020). Application of PCR analysis for determining the species composition of dairy raw materials. *News of the Timiryazev Agricultural Academy*, (6), 16–25. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-6-16-25>
- Ali, S., Farooq, I. (2019). A review of the role of amelogenin protein in enamel formation and novel experimental techniques to study its function. *Protein & Peptide Letters*, 26(12), 880–886. <https://doi.org/10.2174/0929866526666190731120018>
- Banti, M. (2020). Food adulteration and some methods of detection, review. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 9(3), 86–94. <https://doi.org/10.11648/j.jjnfs.20200903.13>
- Baptista, M., Cunha, J. T., & Domingues, L. (2021). DNA-based approaches for dairy products authentication: A review and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.043>
- Chen, R., Chang, L., Chung, Y., Lee, M., & Ling, Y. (2004). Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Communications in Mass Spectrometry*, 18(10), 1167–1171. <https://doi.org/10.1002/rcm.1460>
- Chen, T., Wang, L., Wang, J., & Yang, Q. (2017). A network diffusion model of food safety scare behavior considering information transparency. *Complexity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5724925>
- Choudhary, A., Gupta, N., Hameed, F., & Choton, S. (2020). An overview of food adulteration: Concept, sources, impact, challenges and detection. *International Journal of Chemical Studies*, 8(1), 2564–2573. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1am.8655>
- Di Pinto, A., Conversano, M. C., Forte, V. T., Novello, L., & Tantillo, G. M. (2004). Detection of cow milk in buffalo “mozzarella” by polymerase chain reaction (PCR) assay. *Journal of Food Quality*, 27(6), 428–435. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2004.00662.x>
- Ennis, S., Gallagher, T.F. (1994). A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, 25(6), 425–427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00533.x>
- Fekete, T., Šnirc, M., Belej, L., Židek, R., Golian, J., Haščík, P., Zajác, P. (2017). Authentication of caprine milk and cheese by commercial qPCR assay. *Potravinarstvo*. <https://doi.org/10.5219/780>
- Jianqin, S., Leiming, X., Lu, X., Yelland, G. W., Ni, J., & Clarke, A. J. (2015). Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. *Nutrition journal*, 15, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0147-z>
- Liao, J., & Liu, Y. (2020). Extraction and detection of DNA from UHT milk during storage. *CyTA-Journal of Food*, 18(1), 747–752. <https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1839565>
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Chang, S.Y., Landre, P.A., Abramson, R.D., Gelfand, D.H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2(4), 275–87. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
- Mafra, I., Honrado, M., & Amaral, J. S. (2022). Animal species authentication in dairy products. *Foods*, 11(8), 1124. <https://doi.org/10.3390/foods11081124>
- Masuyama, K., Shojo, H., Nakanishi, H., Inokuchi, S., Adachi, N. (2017). Sex determination from fragmented and degenerated

- DNA by amplified product-length Polymorphism Bidirectional SNP analysis of Amelogenin and SRY genes. *PLoS ONE*, 12(1), e0169348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169348>
- Maudet, C., & Taberlet, P. (2001). Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *Journal of Dairy Research*, 68(2), 229–235. <https://doi.org/10.1017/S0022029901004794>
- Miciński, J., Kowalski, I. M., Zwierzchowski, G., Szarek, J., Pierożyński, B., & Zabłocka, E. (2013). Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine*, 20(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.poamed.2013.07.006>
- Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rocha, F. R. (2017). Recent advances on determination of milk adulterants. *Food chemistry*, 221, 1232–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>
- Poonia, A., Jha, A., Sharma, R., Singh, H. B., Rai, A. K., & Sharma, N. (2017). Detection of adulteration in milk: A review. *International journal of dairy technology*, 70(1), 23–42. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12274>
- Prosser, C. G. (2021). Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *Journal of Food Science*, 86(2), 257–265. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15574>
- Rahmatalla, S. A., Arends, D., & Brockmann, G. A. (2022). Genetic and protein variants of milk caseins in goats. *Frontiers in Genetics*, 13, 995349. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.995349>
- Rodionov, G. V., Amerkhanov, K. A., Solovieva, O. I., Olesyuk, A. P., & Minero, C. S. M. (2021). Biotechnological methods to improve the quality and safety of milk. In *BIO Web of Conferences* (vol. 36, 05002). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213605002>
- Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., & Singh, H. (2020). Composition, structure, and digestive dynamics of milk from different species — A review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 577759. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759>
- Schmidt, J. M., Kjølbaek, L., Jensen, K. J., Rouy, E., Bertram, H. C., Larsen, T., ... & Hammershøj, M. (2020). Influence of type of dairy matrix micro-and macrostructure on in vitro lipid digestion. *Food & function*, 11(6), 4960–4972. <https://doi.org/10.1039/D0FO00785D>
- Smith-Howard, K. (2017). *Pure and modern milk: An environmental history since 1900*. Oxford University Press.
- Trimboli, F., Costanzo, N., Lopreiato, V., Ceniti, C., Morittu, V. M., Spina, A., & Britti, D. (2019). Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. *Journal of dairy science*, 102(7), 5962–5970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16194>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., & Rozen, S.G. (2012). Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vafin, R. R., Galstyan, A. G., Tyulkin, S. V., Gilmanov, K. K., Yurova, E. A., Semipyatniy, V. K., & Bigaeva, A. V. (2022). Species identification of ruminant milk by genotyping of the κ-casein gene. *Journal of Dairy Science*, 105(2), 1004–1013.