

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, О. Ю. Фоменко

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

АННОТАЦИЯ

Введение: Обеспечение безопасности и подлинности молока и продуктов его переработки — первостепенная задача молочного сектора промышленности. Современные молекулярно-генетические технологии позволяют обеспечить эффективное выявление фальсифицированной молочной продукции, а именно оценить наличие подмены одного вида молока другим. Однако исследований, посвященных молекулярной идентификации молочных продуктов, прошедших различные температурные режимы термической обработки, крайне мало. В связи с этим, актуальным направлением становится изучение влияния процессов нагревания молока на деградацию нуклеиновых кислот и последующий их анализ с помощью ПЦР-технологий для определения видового состава в пищевой промышленности.

Цель: Провести сравнительный анализ эффективности методов симплексной и дуплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения происхождения молока и продуктов его переработки, подвергнутых различной термической обработке.

Материалы и методы: Исследование выполнено в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности. Объектами исследования выступали молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, кисломолочные продукты на йогуртовой закваске и полученные на их основе бинарные молочные смеси крупного и мелкого рогатого скота. Данное исследование направлено на применение ПЦР-технологий для решения проблемы определения видового состава молока, полученного от коровы (*Bos taurus*) и козы (*Capra hircus*) и продуктов на их основе. Из образцов пищевых продуктов выделяли суммарную ДНК для последующего анализа методом симплексной и дуплексной ПЦР с помощью набора видоспецифических олигонуклеотидных праймеров.

Результаты: Было проведено сравнение чувствительности симплексного и дуплексного ПЦР-анализа продуктов на основе молока, в ходе которого было установлено, что относительный предел обнаружения коровьей ДНК при использовании дуплексного ПЦР-анализа ниже, чем симплексного, и составил 50 % для сырого молока, 10 % — для пастеризованного молока и кисломолочного продукта на йогуртовой закваске. Чувствительность обнаружения козьей ДНК при дуплексной и симплексной ПЦР оказалась на уровне 1 % за исключением смесей стерилизованного молока: в случае использования дуплексной ПЦР предел обнаружения козьей ДНК был ниже и составил 5 %.

Выводы: Молекулярно-генетические методы с использованием митохондриальных мишеней позволяют определять происхождение молока в молочной продукции. Возможности применения ПЦР при анализе молочных продуктов, прошедших термическую обработку, ограничены размером получаемых ампликонов. Тест-системы на основе ПЦР предоставляют широкие возможности для определения состава и выявления фальсификации продукции в молочной промышленности.

Ключевые слова: ПЦР; видовая идентификация; фальсификация молока; тепловая обработка молока

Корреспонденция:

Алексей Владимирович Хан,
E-mail: a_khan@vniimi.org

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 16.01.2024

Принята: 15.08.2024

Опубликована: 30.09.2024

Финансирование.

Исследовательская работа
проведена за счёт средств
субсидии на выполнение
государственного задания
в рамках Программы
фундаментальных научных
исследований Президиума РАН
(тема № FNSS-2022-0006).

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Хан, А.В., Коваль, Д.Д., Лазарева, Е.Г., & Фоменко, О.Ю. (2024). Сравнительный анализ симплексной и дуплексной ПЦР для выявления фальсификации козьего молока и продуктов его термической обработки. *FOOD METAENGINEERING*, 2(3), 12-24. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.3.63>

Comparative analysis of simplex and duplex PCR for detection of adulteration of goat milk and its heat-treated products

A.V. Khan, D.D. Koval, E.G. Lazareva, O. Yu. Fomenko

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Ensuring the safety and authenticity of milk and technological products of its processing is the primary task of the dairy sector of the industry. Modern molecular genetic technologies make it possible to ensure effective detection of adulterated dairy products, namely to assess the presence of substitution of one type of milk for another. However, there is a significant lack of studies focused on the molecular identification of dairy products that have undergone various thermal processing regimes. In this regard, the influence of milk heating processes on the degradation of nucleic acids and their subsequent analysis using PCR technologies to determine the species composition in the food industry is becoming an actual direction.

Purpose: To conduct a comparative analysis of the effectiveness of simplex and duplex polymerase chain reaction (PCR) methods for determining the origin of milk and milk products subjected to different thermal treatments.

Materials and Methods: The work was carried out in the laboratory of applied microbiology and genomics of microorganisms of the All-Russian Research Institute of Dairy Industry. The objects of the study were raw, pasteurized, sterilized milk, fermented milk products on yogurt starter and binary milk mixtures of cattle and small ruminants obtained on their basis. This study aims to apply PCR technologies to solve the problem of determining the species composition of milk obtained from cow (*Bos taurus*) and goat (*Capra hircus*) and products based on them. Total DNA was extracted from food samples for subsequent analysis by simplex and duplex PCR using a set of species-specific oligonucleotide primers.

Results: The sensitivity of simplex and duplex PCR assays for milk-based products was compared and it was found that the relative detection limit for bovine DNA using duplex PCR was lower than simplex PCR and was 50 % for raw milk, 10 % for pasteurized milk and yoghurt starter sour milk. The sensitivity of detection of goat DNA by duplex and simplex PCR was at the level of 1 % except for sterilized milk mixtures: when duplex PCR was used, the detection limit for goat DNA was lower and amounted to 5 %.

Conclusion: Molecular genetic methods using mitochondrial targets make it possible to determine the origin of milk in dairy products. The possibilities of PCR application in the analysis of heat-treated dairy products are limited by the size of the amplicons obtained. PCR-based test systems provide a wide range of opportunities for composition and adulteration detection in the dairy industry.

Keywords: PCR; species identification; milk adulteration; heat treatment of milk

Correspondence:

A.V. Khan,
E-mail: a_khan@vnimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 16.01.2024

Accepted: 15.08.2024

Published: 30.09.2024

Funding. This research was conducted with the support of a subsidy for executing a government assignment within the framework of the Fundamental Scientific Research Program of the RAS Presidium (Project No. FNSS-2022-0006).

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Khan, A.V., Koval, D.D., Lazareva, E.G., & Fomenko, O. Yu. (2024). Comparative analysis of simplex and duplex PCR for detection of adulteration of goat milk and its heat-treated products. *FOOD METAENGINEERING*, 2(3), 12-24. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.3.63>

ВВЕДЕНИЕ

Молоко — это продукт с высокой пищевой ценностью, играющий ключевую роль в питании человека. Оно обеспечивает организм необходимыми белками, липидами, минералами, жирными кислотами, витаминами и другими важными компонентами (Зобкова и соавт., 2018, Kourkouli et al., 2024). Согласно отчету Продовольственной и сельскохозяйственной Организации Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization), молоко является одним из продуктов животного происхождения, который может способствовать достижению целей устойчивого развития, установленных согласно резолюции Генеральной Ассамблеи ООН A/RES/71/313 от 6 июля 2017 года¹. При правильном питании молоко может помочь в борьбе с истощением детей до 5 лет, низким весом при рождении, задержкой в росте, анемией у женщин репродуктивного возраста, ожирением и инфекционными заболеваниями². Рекомендуемая норма потребления молока и молочных продуктов составляет 325 килограммов в год на душу населения (Агарков и соавт., 2023). Аналитические исследования прогнозируют, что с 2024 по 2028 год рынок молочных продуктов будет расти ежегодно на 7,32 %³.

Коровье и козье молоко — одни из самых востребованных видов молока в мире (Hazra et al., 2017). По словам бывшего министра сельского хозяйства РФ Дмитрия Патрушева, в 2023 году было произведено 33,5 млн тонн коровьего молока, что на 1,2 млн тонн больше, чем в 2021 г. (Зимняков и соавт., 2023). Годовое производство козьего молока остаётся на уровне 236–255 тыс. тонн⁴. Состав и свойства молока во многом видоспецифичны (Шувариков и соавт., 2018, Barłowska, et al., 2012). Коровье молоко является наиболее доступным и дешевым видом молока. Корова дает гораздо больше молока, чем другой молочный скот (~15 л/сут). По сравнению с козьим молоком, оно содержит больше железа, серы, цинка, молибдена, рибонуклеазы, липазы, щелочной фосфатазы и ксантиносидазы. Однако козье молоко содержит больше кальция, калия, магния, фосфора, хлора и марганца, и меньше лактозы, что делает его более подходящим для людей с недостатком фермента лактазы (Меркушева и соавт., 2005; Golinelli et al., 2014).

В современной молочной промышленности наблюдается растущий тренд на производство продуктов из смеси коровьего и козьего молока. Такое сочетание не только объединяет уникальные питательные свойства обоих видов молока, но и обеспечивает достаточно доступную цену для потребителя. Так же козье молоко как обогащающий компонент применяется для создания продуктов функциональной направленности (Мельденберг и соавт., 2020; Lad et al., 2017).

Однако в связи с короткими сроками хранения сырого молока, данный вид продукта часто подвергается различным способам обработки: механической (сепарирование, гомогенизация и др.), термической (пастеризация, стерилизация и др.) и др. (Шегидевич, 2021; Чарыков и соавт., 2017). Также следует учитывать, что идентифицировать подлинный состав молочных продуктов, подвергшихся различным этапам технологических процессов и установить наличие подмены молока в продукции из козьего молока и других видов домашнего скота, весьма сложно (Lopez-Calleja et al., 2004).

Борьба с фальсификацией молочных продуктов является высоким приоритетом мирового сообщества, поскольку такие продукты потребляются уязвимыми группами населения: детьми, беременными женщинами, пожилыми и больными людьми. Употребление поддельных молочных продуктов представляет серьезную угрозу для здоровья и жизни этих категорий населения из-за возможных аллергических реакций и других негативных последствий (Гильманов и соавт., 2020; Handford, et al., 2016). Особое внимание необходимо уделить детским сухим молочным смесям, предназначенным для искусственного вскармливания, поскольку подмена одного вида молока другим в данном случае неприемлема. Многие потребители отдают предпочтение смесям, на основе козьего молока, поскольку существует множество данных о том, что козье молоко в силу своего состава лучше усваивается организмом ребенка (Захарова с соавт., 2021). Несмотря на растущую популярность данных продуктов, до сих пор не существует

¹ Assembly, G. (2017). Resolution adopted by the General Assembly on 6 July 2017. In Technical Report A/RES/71/313.

² FAO. (2023). Contribution of Terrestrial Animal Source Food to Healthy Diets for Improved Nutrition and Health Outcomes—an Evidence and Policy Overview on the State of Knowledge and Gaps.

³ Statista. (2024). Dairy products & eggs worldwide: Statista's forecast. <https://www.statista.com/outlook/cmo/food/dairy-products-eggs/worldwide>

⁴ Milknews (2023). Что происходит на рынке коровьего молока. <https://milknews.ru/longridy/Chto-proishodit-na-rynke-kozego-moloka.html>

стандартов, регулирующих проверку молока на его видоспецифичность.

Широкое применение для определения видовой принадлежности молочных продуктов получили молекулярно-генетические методы (Гильманов и соавт., 2020; Pokorska, et al., 2016). К их числу относится метод простой или симплексной ПЦР (simplex PCR), которая проводится с одной парой праймеров (Wang et al., 2020; López-Calleja et al., 2004; Hazra et al., 2017). Симплексная ПЦР позволяет идентифицировать ДНК как одного, так и нескольких видов животных, но для идентификации нескольких видов животных необходимо подбирать универсальные праймеры, которые после амплификации дадут ПЦР-продукты разной длины. Однако не всегда есть возможность создать универсальные праймеры, которые давали бы однозначный результат на электрофореграмме, а именно имели бы четко различимую разницу по длине получаемых ПЦР-продуктов. Поэтому в качестве альтернативы прибегают к мультиплексной ПЦР (Multiplex PCR (M-PCR)), для проведения которой требуется одновременное использование несколько пар праймеров в одной реакции.

В настоящее время системы мультиплексной ПЦР были разработаны для видоидентификации молока и молочных продуктов из ослиного, верблюжьего, лошадиного, козьего и коровьего молока (Deng et al., 2020). Предыдущие опубликованные исследования в основном акцентируют внимание на обнаружении видовой фальсификации в сыром молоке (Kourkouli et al., 2024; Rodrigues et al., 2012) и/или сыре (Golinelli et al., 2014). Число работ, рассматривающих потенциальные проблемы идентификации продуктов из молока с различным уровнем тепловой обработки, чрезвычайно мало. В связи с разнообразием продуктового ассортимента на рынке в молочной индустрии следует интенсивно расширять область применения универсальных способов выявления фальсификации в пищевой продукции, в независимости от технологических способов ее получения.

Целью данного исследования являлось проведение сравнительного анализа эффективности методов симплексной и дуплексной ПЦР для определения происхождения молока-сырья и продуктов его термической переработки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Сырое козье и коровье молоко, приобретённое на местном сельскохозяйственном рынке, а также полученные на их основе в лабораторных условиях пастеризованное и стерилизованное молоко, кисломолочные продукты на йогуртовой закваске и приготовленные бинарные смеси молочных матриц с различным объёмным содержанием молока разных видов.

Подготовка образцов

Пастеризованное и стерилизованное молоко

Пастеризацию сырого молока осуществляли при температуре $90 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 5 минут на водяной бане. Стерилизацию молока проводили автоклавированием при температуре $121 \pm 2^\circ\text{C}$ и давлении 0,15 МПа в течение 3 минут в паровом стерилизаторе NB-1 100 (N-Biotek, Южная Корея).

Кисломолочные продукты на йогуртовой закваске

Для получения кисломолочных продуктов использовали жидкие закваски, изготовленные на основе стерилизованного козьего и коровьего молока. В каждый тип молока были добавлены культуры микроорганизмов из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ» *Str. thermophilus* (штамм бкб) и *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (штамм L37/7). После добавления культур молоко охлаждали до температуры сквашивания, затем оно инкубировалось при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ в термостате на протяжении ночи.

При выработке кисломолочных продуктов в предварительно пастеризованное и охлажденное молоко добавляли 5 % жидкой йогуртовой закваски, далее смесь вновь подвергалась термостатной инкубации при температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$ на протяжении 4 часов. По завершении процесса инкубации кисломолочные продукты охлаждали до температуры $25\text{--}30^\circ\text{C}$, тщательно перемешивали и переводили для хранения в холодильную камеру, где они сохранялись при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ на протяжении ночи.

Бинарные смеси

Из образцов полученных продуктов термической обработки готовили молочные смеси с различным объёмным соотношением козьего и коровьего молока:

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

100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 10, 5, 2, 1 и 0 % (козьего молока).

Экстракция ДНК

Образцы молочной продукции объемом 1 мл (жидкие) или 0,5 мл (йогурты) центрифугировали при 10 000 g в течении 5 минут с последующим удалением надосадочной жидкости. Полученный осадок использовался в качестве источника для выделения нуклеиновых кислот с использованием наборов «ДНК-Сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Олигонуклеотидные праймеры

Последовательности олигонуклеотидных праймеров были заимствованы из работы Deng et al., 2020 (Таблица 1).

Симплексная и дуплексная ПЦР-амплификация

Амплификацию специфического участка гена 16S рПНК *Bos taurus* проводили методом ПЦР с помощью видоспецифических праймеров BT-F и BT-R при температуре отжига 57 °С. ПЦР-скрининг проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоявшей из 5 мкл 5xScreen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл 10мМ праймера BT-F, 1 мкл 10мМ праймера BT-R, 1 мкл образца ДНК и 17 мкл деионизированной воды (ЗАО «Евроген», Россия).

Амплификацию специфического участка гена D-петли *Capra hircus* проводили методом ПЦР с использованием видоспецифических праймеров CH-F и CH-R. ПЦР-скрининг проводили в 25 мкл реакционной смеси, включавшей в себя 5 мкл 5xScreen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл 10мМ праймера CH-F, 1 мкл 10мМ праймера CH-R,

1 мкл образца ДНК и 17 мкл деионизированной воды (ЗАО «Евроген», Россия).

Реакционная смесь для одновременной дуплексной ПЦР-амплификации специфических фрагментов митохондриальных геномов коров и коз методом дуплексной ПЦР состояла из 5 мкл 5xScreen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл 10мМ праймера BT-F, 1 мкл 10мМ праймера BT-R, 1 мкл 10мМ праймера CH-F, 1 мкл 10мМ праймера CH-R, 1 мкл образца ДНК и 15 мкл деионизированной воды (ЗАО «Евроген», Россия).

Амплификацию проводили на приборе MiniAmp (ThermoFisher Scientific, США) с использованием следующей программы: первичная денатурация 95 °С в течение 5 минут; 35 циклов следующего вида: денатурация при 95 °С в течение 15 секунд; отжиг праймеров в течение 15 секунд при температуре 57 °С; элонгация цепей при 72 °С в течение 30 секунд; финальная элонгация цепей в течение 10 минут при 72 °С. Теоретически ожидаемая длина получаемых ампликонов для *Bos taurus* и *Capra hircus* составляла 583 и 184 п.о. соответственно.

При этом при проведении ПЦР-анализов всегда использовали контроли: отрицательный контроль представляет собой образец, в котором вместо ДНК добавляют воду в реакционную смесь, два других контроля — образцы с чистой геномной ДНК коровы и геномной ДНК козы, выделенных из ушных выщипов жвачных животных.

Аналитический электрофорез

Анализ результатов ПЦР проводили путём разделения ампликонов в 2 % геле агарозы I (VWR International LLC, США), окрашенном раствором бромистого этидия, при напряжении электрического поля 7 В/см геля. В качестве маркера длин фрагментов ДНК был использован «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). Резуль-

Таблица 1
Характеристики олигонуклеотидных праймеров

Table 1
Characteristics of Oligonucleotide Primers

Ген	Праймер	Последовательность	Размер продукта	Локализация
16S рПНК	BT-F	5'-ACCCTCTCGACTAAACAACCAAGATAG-3'	583 п.н.	NC_006853.1
	BT-R	5'-TGGGGCTAGGAGTTAATCATTTGTTG-3'		
D-loop	CH-F	5'-ACTCCACAAGCTTACAGACATGCCA-3'	184 п.н.	NC_005044.2
	CH-R	5'-GAAGGCTGTATGTCCGCGTTATATG-3'		

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

таты гель-электрофореза визуализировали с помощью системы гель-документирования Vilber E-Box-CX5.TS (Vilber, Франция), на трансиллюминаторе Vilber Super-Bright (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ бинарных молочных матриц
симплексной ПЦР

На первом этапе проверили пригодность пары праймеров BT-F и BT-R для обнаружения целевой последовательности рибосомальной 16S РНК генома *Bos taurus* (корова) методом симплексной ПЦР в смоделирован-

ных в условиях лаборатории модельных смесях козьего и коровьего молока, имитировавших различный уровень фальсификации сырья. Аналогично, но уже с использованием пары специфических праймеров CH-F и CH-R, комплиментарных последовательностям митохондриального генома *Capra hircus* (коза), выявляли присутствие козьей ДНК в вышеописанных бинарных молочных смесях. В молочных матрицах доля примеси коровьего молока (v/v) варьировала от 1 до 99%. В ходе анализа электрофореграмм было установлено, что праймеры BT-F и BT-R позволяют эффективно выявлять примесь коровьего молока в козьем начиная с 1% как в сыром (Рисунок 1), так и в пастеризованном молоке (Рисунок 2). При этом во всех исследуемых образцах

Рисунок 1
Электрофореграмма продуктов амплификации
фрагментов гена 16S рРНК коровы (верхний ряд)
и D-петли козы (нижний ряд) в ходе симплексной ПЦР

Figure 1
Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA
Gene Fragments in Cattle (Top Row) and D-Loop in Goats
(Bottom Row) During Simplex PCR



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из смесей сырого козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0% (козьего молока); «К-» — отрицательный контроль; «К+» — ДНК козы; М — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Note. 1–14 — DNA samples extracted from raw goat and cow milk mixtures in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0% (goat milk); “K-” — negative control; “K+” — goat DNA; M — DNA length marker “100 + bp DNA Ladder”

Рисунок 2
Электрофореграмма продуктов амплификации
фрагментов гена 16S рРНК коровы (верхний ряд)
и D-петли козы (нижний ряд) в ходе симплексной ПЦР

Figure 2
Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA
Gene Fragments in Cattle (Top Row) and D-Loop in Goats
(Bottom Row) During Simplex PCR



Примечание. 1–14 — образцы с ДНК, выделенной из смесей пастеризованного козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0% (козьего молока); «К-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК коровы; «K2+» — ДНК козы; М — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Note. 1–14 — DNA samples extracted from mixtures of pasteurized goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0% (goat milk); “K-” — negative control; “K1+” — cow DNA; “K2+” — goat DNA; M — DNA length marker “100 + bp DNA Ladder”

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

с коровьей ДНК наблюдался ампликон с теоретически ожидаемым размером — 583 п.н.

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 (Рисунки 1–4), поскольку во всех пробах с наличием козьей ДНК наблюдался ПЦР-продукт видоспецифической амплификации размером 184 п.н.

Аналогичные результаты были получены при использовании симплексной ПЦР для выявления содержания

коровьего молока в образцах кисломолочных продуктов, приготовленных на йогуртовой закваске. Предел обнаружения ДНК коровы составил 1 % (Рисунок 3).

Однако при попытке амплификации фрагмента коровьего гена 16S рРНК длиной 583 пары нуклеотидов на матрице суммарной ДНК, выделенной из стерилизованного молока, продукты реакции не наблюдались ни в одном из рассмотренных случаев (Рисунок 4). Вероятно, данный факт связан с сильным повреждением молекул ДНК в процессе стерилизации сырого молока, приводящей к образованию фрагментов с длиной, не-

Рисунок 3

Электрофореграмма продуктов ПЦР амплификации фрагментов гена 16S рРНК коровы (верхний ряд) и D-петли козы (нижний ряд)

Figure 3

Electrophoregram of PCR Amplification Products of 16S rRNA Gene Fragments in Cattle (Top Row) and D-Loop in Goats (Bottom Row)



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске из смесей пастеризованного козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0 % (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K+» — ДНК козы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder».

Note. 1–14 — DNA samples extracted from fermented dairy products made with yogurt starter cultures from mixtures of pasteurized goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0 % (goat milk); «K-» — negative control; «K+» — goat DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder».

Рисунок 4

Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов гена 16S рРНК коровы (верхний ряд) и D-петли козы (нижний ряд) при симплексной ПЦР

Figure 4

Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA Gene Fragments in Cattle (Top Row) and D-Loop in Goats (Bottom Row) During Simplex PCR



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из смесей стерилизованного козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0 % (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК коровы; «K2+» — ДНК козы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder».

Note. 1–14 — DNA samples extracted from mixtures of sterilized goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0 % (goat milk); «K-» — negative control; «K1+» — cow DNA; «K2+» — goat DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder».

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

достаточной 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.

Анализ бинарных молочных матриц дуплексной ПЦР

Следующим этапом было проведение дуплексной ПЦР с одновременным использованием двух пар праймеров в одной пробирке для определения относительной чувствительности анализа. ПЦР-продукт размером 583 п.н. не наблюдался при использовании образцов смесей с минимальным внесением коровьего молока, в то время как бэнды, соответствующие целевому продукту с козьего генома присутствовали. 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 5).

Относительный предел чувствительности дуплексного ПЦР-анализа смесей пастеризованного молока составил 10 % объёмной примеси коровьего молока, что ниже, чем при симплексной ПЦР (Рисунок 6). Напротив, ампликоны, полученные с митохондриальной ДНК козы, были визуально различимы и присутствовали в образцах 1–10 на электрофореграммах всех исследованных бинарных матриц (Рисунки 5–8), что указывает на высокую чувствительность дуплексной ПЦР при амплификации козьей ДНК, нижний предел которой составил 5 % для стерилизованного молока и 1 % — для остальных продуктов (Рисунки 5–7).

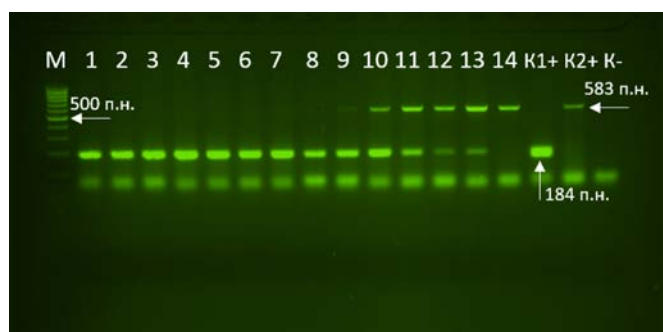
По сравнению с ПЦР с применением одной пары праймеров ПЦР с двумя парами праймерами демонстрировала более низкую чувствительность и в случае кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске, приготовленных с использованием смесей козьего и коровьего молока. Предел обнаружения примеси коровьего молока составил 10 %.

Рисунок 5

Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов генов 16S рРНК коровы и D-петли при проведении дуплексной ПЦР

Figure 5

Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA Gene Fragments in Cattle and D-Loop During Duplex PCR



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из смесей сырого козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0 % (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК козы; «K2+» — ДНК коровы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Note. 1–14 — DNA samples extracted from mixtures of raw goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0 % (goat milk); «K-» — negative control; «K1+» — goat DNA; «K2+» — cow DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder»

Рисунок 6

Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов генов 16S рРНК коровы и D-петли в процессе дуплексной ПЦР

Figure 6

Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA Gene Fragments in Cattle and D-Loop During Duplex PCR



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из смесей пастеризованного козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0 % (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК козы; «K2+» — ДНК коровы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Note. 1–14 — DNA samples extracted from mixtures of pasteurized goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0 % (goat milk); «K-» — negative control; «K1+» — goat DNA; «K2+» — cow DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder»

Рисунок 7

**Электрофореграмма продуктов амплификации
фрагментов генов 16S рРНК коровы и D-петли в ходе
дуплексной ПЦР**

Figure 7

**Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA
Gene Fragments in Cattle and D-Loop During Duplex PCR**



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из кисломолочных продуктов на йогуртовой закваске, полученных из смесей козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0% (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК козы; «K2+» — ДНК коровы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder»

Note. 1–14 — DNA samples extracted from fermented dairy products made with yogurt starter cultures from mixtures of goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0% (goat milk); «K-» — negative control; «K1+» — goat DNA; «K2+» — cow DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder».

Далее была проведена дуплексная ПЦР, которая также показала, что в данных препаратах ДНК происходит только специфическая амплификация фрагмента D-петли *C. hircus* (Рисунок 8).

При проведении дуплексной ПЦР на ДНК смесях 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 %. Возможно, это снижение связано с тем, что наличие четырёх праймеров в ПЦР-реакции негативно влияет на её эффективность. Результат амплификации коровьей ДНК совпал с тем, который был бы получен при использовании одной пары праймеров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель текущего исследования заключалась в сравнении эффективности современных молекулярно-генетических методов (simplex и multiplex PCR) для определения

Рисунок 8

**Электрофореграмма продуктов амплификации
фрагментов генов 16S рРНК коровы и D-петли в ходе
дуплексной ПЦР**

Figure 8

**Electrophoregram of Amplification Products of 16S rRNA
Gene Fragments in Cattle and D-Loop During Duplex PCR**



Примечание. 1–14 — образцы ДНК, выделенной из смесей стерилизованного козьего и коровьего молока в соотношениях: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1 и 0% (козьего молока); «K-» — отрицательный контроль; «K1+» — ДНК козы; «K2+» — ДНК коровы; M — маркер длин ДНК «100 + bp DNA Ladder».

Note. 1–14 — DNA samples extracted from mixtures of sterilized goat and cow milk in the following ratios: 100, 99, 98, 95, 90, 85, 80, 75, 50, 25, 5, 2, 1, and 0% (goat milk); «K-» — negative control; «K1+» — goat DNA; «K2+» — cow DNA; M — DNA length marker «100 + bp DNA Ladder».

видовой принадлежности молока и продуктов на его основе, полученных при различных уровнях температурных режимов. Мы провели анализ проб молочных матриц с помощью симплексной и дуплексной ПЦР с использованием праймеров на *C. hircus* и *B. taurus*. При этом условия термоциклирования были идентичны для всех ПЦР. После провели разделение полученных ампликонов в геле для выявления наиболее оптимального метода ПЦР. Результаты показали, что по сравнению с дуплексной ПЦР, симплексная ПЦР — более эффективный метод видовой идентификации молочной продукции. Нами установлено, что использование одной или двух пар олигонуклеотидных праймеров оказывает значительный эффект на чувствительность методов молекулярной биологии. Simplex PCR доказала свою надежность, благодаря возможности обнаружения даже следовых количеств подмены молока, что критично при тестировании молочной продукции. Данный факт вероятно связан с тем, что в реакционной смеси происходят конкурирующие процессы олигонуклеотидов, приводящие к снижению накопления целевых продук-

тов амплификации при мультиплексной ПЦР (Kalle, et al., 2014). Существует риск неспецифического связывания одноцепочечных ДНК, который может привести к амплификации димеров праймеров и снижению чувствительности. Например, Hird et al. (2006) сосредоточили своё внимание на оценке взаимосвязи скорости амплификации и размере ампликонов, получаемых с пищевых матриц. В ходе эксперимента было обнаружено, что, хотя малый размер ампликонов и увеличивает вероятность амплификации, но одновременно повышает риск появления неспецифических продуктов реакции. Полученные результаты подтвердили наше предположение о том, что методы молекулярной генетики оптимальны для обнаружения специфических генетических локусов в продуктах, вырабатываемых из молока. Особо интересным оказался результат ПЦР при анализе стерилизованного молока, где мы наблюдали амплификацию только коротких фрагментов ДНК. Влияние процессов нагревания молока на деградацию нуклеиновых кислот требует дальнейшего изучения.

По мнению ряда авторов, развитие и апробация современных молекулярных методов анализа становится приоритетным и перспективным направлением для подтверждения подлинности товаров народного потребления (Lopez-Calleja et al., 2004; Golinelli et al., 2014; Galal-Khallaf et al., 2021). Среди таких методов наибольшее распространение получили подходы, основанные на полимеразной цепной реакции с использованием одной или нескольких пар олигонуклеотидных праймеров, таких как симплексная, дуплексная и мультиплексная ПЦР, которые позволяют амплифицировать целевые генетические маркеры (De et al., 2011; Guo et al., 2018; Lopez-Calleja et al., 2004; Galal-Khallaf et al., 2021). Классическими примерами таких маркеров, широко используемых в молочной и мясной промышленности, являются рибосомальные гены, например, 12S и 16S рРНК, которые играют ключевую роль в процессах транскрипции клеток (Tuncay et al., 2022). Применение гена 16S рРНК особенно распространено в филогенетических исследованиях благодаря его наличию во всех клеточных формах, высокой консервативности функций, чередованию консервативных и вариабельных участков внутри гена, а также отсутствию горизонтального переноса этого гена между организмами (Stackebrandt, 2009). В научных трудах по вопросам аутентичности молочного сырья также часто используется митохондриальная ДНК, включая гены *cytB* и *D*-петлю, последняя из которых, благодаря своему высокому уровню

изменчивости, обладает особой ценностью для этих исследований (Putri et al., 2019). Например, в работе Deng et al. (2020) для исследования фальсификации сырого молока разных видов и продуктов его термической обработки были использованы митохондриальные мишени, такие как 16S рРНК и *D*-петля. Исследования проводились при температурных режимах пастеризации 62–65 °С в течение 30 минут и стерилизации 135–150 °С в течение 2–6 секунд. В отличие от их подхода, в нашем исследовании использовались иные температурные режимы: пастеризация при 90 ± 2 °С в течение 5 минут и стерилизация при 121 ± 2 °С в течение 3 минут. Кроме того, был проведён анализ кисломолочных продуктов, полученных на основе молока, прошедшего описанную выше термическую обработку.

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что при дизайне и подборе олигонуклеотидных праймеров для успешной амплификации фрагментов видоспецифических молекулярных маркеров обязательно следует учитывать размер ампликонов при разработке тест-систем для идентификации видового состава термически обработанных молочных продуктов. Также полученные данные подчеркивают важность учета комплексной переработки молочного сырья при установлении нарушений технологии производства, поскольку высокотемпературные режимы могут оказывать негативное воздействие на нуклеиновые кислоты. Разработка панели праймеров, позволяющей амплифицировать участки митохондриальных геномов жвачных животных длиной около 100 п.о. позволит повысить чувствительность дуплексной ПЦР и получить сравнимую с симплексными системами эффективность реакции. Кроме того, особое внимание стоит уделить различным способам тепловой обработки молочного сырья: диапазон температур, продолжительность выдержки и охлаждения, а также другим значимым технологическим параметрам, используемым при производстве молочных продуктов.

Одним из ключевых ограничений данного исследования являлся узкий выбор температурных и временных параметров, использованных для выработки молочных продуктов. В дополнение к этому молекулярное тестирование проводилось с помощью пар праймеров, способных амплифицировать только ПЦР-продукты размером 184 п.н. и 583 п.н., что не позволяет учитывать потенциальные риски возникновения ложноотрицательных, ложноположительных результатов

ПЦР при синтезе фрагментов большей или меньшей протяженности. В связи с этим заслуживает внимание проверка молочного сырья с использованием олигонуклеотидных праймеров, позволяющих синтезировать фрагменты длины, отличной от вышеописанных. Несмотря на данные ограничения, мы убеждены, что результаты демонстрируют основные проблемы анализа термически обработанных молочных продуктов и способы их преодоления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование подтверждает эффективность применения молекулярно-генетических методов, в частности ПЦР (simplex и duplex), для видовой идентификации молочных продуктов, подвергшихся различным видам термической обработки. Чувствительность simplex ПЦР оказалась выше по сравнению с duplex ПЦР, что делает её предпочтительным методом для обнаружения малых количеств примесей молока другого вида. Важно отметить, что стерилизация молока вызывает значительное разрушение ДНК, что усложняет амплификацию более крупных фрагментов генов, что подтверждает необходимость разработки более устойчивых методов анализа для таких проб. Предложенные молекулярно-генетические методы могут быть эффективно использованы для выявления фальсификаций в молочных продуктах, что является важным шагом для защиты прав потребителей и обеспечения подлинности продукции на рынке. Разработанные подходы могут быть внедрены в практику как при контроле производства молочных продуктов, так и для разработки новых стандартов по видовой идентификации в молочной промышленности.

Для дальнейшего совершенствования методов необходимо сосредоточить внимание на разработке более чувствительных тест-систем, которые будут использовать панели праймеров, способных амплифицировать короткие фрагменты ДНК, что обеспечит более высокую точность и надёжность при анализе. Также перспективным направлением дальнейших исследований является

изучение влияния различных технологических параметров производства на фрагментацию ДНК, что позволит улучшить существующие методы контроля подлинности молочных продуктов и расширить возможности их применения в промышленности.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Алексей Владимирович Хан: общее руководство и дизайн исследования; подготовка и создание рукописи, проведение экспериментальных исследований, сбор и анализ полученных данных.

Дарья Дмитриевна Коваль: подготовка и создание рукописи, проведение экспериментальных исследований, сбор и анализ полученных данных.

Екатерина Германовна Лазарева: визуализация, формулирование исследовательских целей и задач, сбор и анализ полученных данных.

Олег Юрьевич Фоменко: общее руководство и дизайн исследования, курирование данных, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Alexey Vladimirovich Khan: overall supervision and study design; manuscript preparation and development, conducting experimental research, data collection and analysis.

Daria Dmitrievna Koval: manuscript preparation and development, conducting experimental research, data collection and analysis.

Ekaterina Germanovna Lazareva: visualization, formulation of research objectives and tasks, data collection and analysis.

Oleg Yuryevich Fomenko: overall supervision and study design, data curation, editing, and approval of the final version of the article.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Агарков, К. В., & Пряничникова, Н. С. (2023). Актуальность разработки новых видов сухих смесей на молочной основе. *Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XI Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых* (с. 94–96). Кемерово: Кемеровский государственный университет.
- Agarov, K. V., & Pryanichnikova, N. S. (2023). Relevance of developing new types of dry milk-based mixtures. *Food innovations and biotechnology: Proceedings of the 11th All-Russian (National) Scientific Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists* (pp. 94–96). Kemerovo: Kemerovo State University. (In Russ.)
- Гильманов, Х. Х., Вафин, Р. Р., Блиадзе, В. Г., & Михайлова, И. Ю. (2020). Проблема фальсификации видовой принадлежности молока. *Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*, 1(1), 125–129. <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-125-129>
- Gilmanov, Kh. Kh., Vafin, R. R., Bliadze, V. G., & Mikhailova, I. Yu. (2020). The problem of falsification of milk species. *Aktual'nye voprosy molochnoy promyshlennosti, mezhotraslevye tekhnologii i sistemy upravleniya kachestvom*, 1(1), 125–129. (In Russ.) <https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-125-129>
- Захарова, И.Н., & Сугян, Н.Г. (2021). Использование козьего молока в питании детей раннего возраста (клинические примеры). *Медицинский совет*, (17), 175–181. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-17-175-181>
- Zakharova, I.N., & Sugyan, N.G. (2021). The use of goat's milk in the nutrition of young children (clinical examples). *Medical Council*, (17), 175–181. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-17-175-181>
- Зимняков, В. М., Ильина, Г. В., Ильин, Д. Ю., & Зимняков, А. М. (2023). Состояние, проблемы и перспективы производства молока в России. *Техника и технологии в животноводстве*, 1(49), 4–10. <https://doi.org/10.22314/27132064-2023-1-4>
- Zimnyakov, V. M., Ilyina, G. V., Ilyin, D. Yu., & Zimnyakov, A. M. (2023). State, problems and prospects of milk production in Russia. *Machinery and technologies in livestock*, 1(49), 4–10. (In Russ.) <https://doi.org/10.22314/27132064-2023-1-4>
- Зобкова, З. С., Фурсова, Т. П., & Зенина, Д. В. (2018). Выбор белковых ингредиентов, обогащающих и модифицирующих структуру кисломолочных напитков. *Актуальные вопросы индустрии напитков*, (2), 64–69. <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-64-69>
- Zobkova, Z. S., Fursova, T. P., & Zenina, D. V. (2018). Selection of protein ingredients that enrich and modify the structure of fermented milk drinks. *Aktual'nye voprosy industrii napitkov*, (2), 64–69. (In Russ.) <https://doi.org/10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-64-69>
- Мельденберг, Д. Н., Полякова, О. С., Семёнова, Е. С., & Юрова, Е. А. (2020). Разработка комплексной оценки белкового состава молока сырья различных сельскохозяйственных животных для выработки продуктов функциональной направленности. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (3), 118–133. <https://doi.org/10.36107/spfp.2020.352>
- Meldenberg, D. N., Polyakova, O. S., Semyonova, E. S., & Yurova, E. A. (2020). Development of a comprehensive assessment of the protein composition of raw milk from various farm animals for the development of functional products. *Storage and Processing of Farm Products*, (3), 118–133. (In Russ.) <https://doi.org/10.36107/spfp.2020.352>
- Меркушева, И. Н., Петриченко, С. П., & Кожухова, М. А. (2005). Пищевая и биологическая ценность козьего молока. *Известия вузов. Пищевая технология*, (2–3), 44–46.
- Merkusheva, I. N., Petrichenko, S. P., & Kozhukhova, M. A. (2005). Nutritional and biological value of goat milk. *Izvestiya vuzov. Food technology*, (2–3), 44–46. (In Russ.)
- Чарыков, В. И., Злыднев, А. Н. (2017). Анализ электрофизических методов пастеризации молока. *Приоритетные направления развития энергетики в АПК*, 1(1), 34–38.
- Charykov, V. I., Zlydnev, A. N. (2017). Analysis of electrophysical methods of milk pasteurisation. *Prioritetnye napravleniya razvitiya energetiki v APK*, 1(1), 34–38. (In Russ.)
- Шегидевич, Е. Д. (2021). Изменение белкового состава молочного сырья при механической и термической обработке. *Молодежь в науке-2021*, 1(1), 131–133.
- Shegidevich, E. D. (2021). Changes in protein composition of dairy raw materials during mechanical and thermal processing. *Molodezh' v nauke-2021*, 1(1), 131–133. (In Russ.)
- Шуварики, А. С., Канина, К. А., Робкова, Т. О., & Юрова, Е. А. (2018). К вопросу оценки состава овечьего, козьего и коровьего молока. *Овцы, козы, шерстяное дело*, 1(1), 20–22.
- Shuvarikov, A. S., Kanina, K. A., Robkova, T. O., & Yurova, E. A. (2018). On the issue of assessing the composition of sheep, goat and cow milk. *Sheep, goats, wool business*, 1(1), 20–22. (In Russ.)
- Юрова, Е. А., Жижин, Н. А., & Фильчакова, С. А. (2020). Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции. *Вестник МГТУ*, 23(3), 214–223. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2020-23-3-214-223>
- Yurova, E. A., Zhizhin, N. A., & Filchakova, S. A. (2020). Application of the PCR analysis method to determine the

- species composition of dairy raw materials. *Vestnik of MSTU*, 23(3), 214–223. (In Russ.) <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-6-16-25>
- Barłowska, J., Wolanciuk, A., Litwińczuk, Z., & Król, J. (2012). Milk proteins' polymorphism in various species of animals associated with milk production utility. *Milk protein* (pp. 235–264). InTech.
- Caldwell, J. M., Pérez-Díaz, I. M., Sandeep, K. P., Simunovic, J., Harris, K., Osborne, J. A., & Hassan, H. M. (2015). Mitochondrial DNA fragmentation as a molecular tool to monitor thermal processing of plant-derived, low-acid foods, and biomaterials. *Journal of Food Science*, 80(8), 1804–1814. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12937>
- De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singha K., Singh R., Datta, T., Goswami, S. L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*, 22(5), 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.026>
- Deng, L., Li, A., Gao, Y., Shen, T., Yue, H., Miao, J., Li, R., Yang, J. (2020). Detection of the bovine milk adulterated in camel, horse, and goat milk using duplex PCR. *Food Analytical Methods*, 13, 560–567. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01678-2>
- Galal-Khallaf, A., Hussein, D., & El-Sayed Hassab El-Nabi, S. (2021). Single nucleotide polymorphism-based methodology for authentication of bovine, caprine, ovine, camel, and donkey meat cuts. *Journal of Food Science*, 86(10), 4444–4456. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15885>
- Golinelli, L. P., Carvalho, A. C., Casaes, R. S., Lopes, C. S. C., Deliza, R., Paschoalin, V. M. F., & Silva, J. T. (2014). Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6693–6699. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7990>
- Guo, L., Qian, J. P., Guo, Y. S., Hai, X., Liu, G. Q., Luo, J. X., & Ya, M. (2018). Simultaneous identification of bovine and equine DNA in milks and dairy products inferred from triplex TaqMan real-time PCR technique. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6776–6786. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14408>
- Handford, C. E., Campbell, K., & Elliott, C. T. (2016). Impacts of milk fraud on food safety and nutrition with special emphasis on developing countries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 130–142. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12181>
- Hazra, T., Sharma, V., Sharma, R., & Arora, S. (2016). Simplex PCR assay for detection of cow milk presence in goat milk. *Indian Journal of Dairy Science*, 69(5), 621–625.
- Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., Popping, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives and Contaminants*, 23(7), 645–650. <https://doi.org/10.1080/02652030600603041>
- Kalle, E., Kubista, M., & Rensing, C. (2014). Multi-template polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.11.002>
- Kourkouli, A., Thomaidis, N., Dasenaki, M., & Markou, A. (2024). Novel and sensitive touchdown polymerase chain reaction assays for the detection of goat and sheep milk adulteration with cow milk. *Molecules*, 29(8), 1820. <https://doi.org/10.3390/molecules29081820>
- Lad, S. S., Aparnathi, K. D., Mehta, B., & Velpula, S. (2017). Goat milk in human nutrition and health – A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 1781–1792. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.194>
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Rodríguez, M. A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2004). Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2839–2845. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73412-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73412-8)
- Pokorska, J., Kułaj, D., Dusza, M., Żychlińska-Buczek, J., & Makulska, J. (2016). New rapid method of DNA isolation from milk somatic cells. *Animal Biotechnology*, 27(2), 113–117. <https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1116446>
- Putri, A. E., Farajallah, A., & Perwitasari, D. (2019). The origin of pesisir cattle based on D-loop mitochondrial DNA. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200919>
- Rodrigues, N. P. A., Givisiez, P. E. N., Queiroga, R. C. R. E., Azevedo, P. S., Gebreyes, W. A., & Oliveira, C. J. B. (2012). Milk adulteration: Detection of bovine milk in bulk goat milk produced by smallholders in northeastern Brazil by a duplex PCR assay. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2749–2752. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5235>
- Stackebrandt, E. (2009). Phylogeny based on 16S rRNA/DNA. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons.
- Tuncay, R. M., & Sancak, Y. C. (2022). Comparison of PCR methods for determination of different types of milk added to goat milk. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(3), 509–514. <https://doi.org/10.53424/balikesirsbd.1139179>
- Wang, Z., Li, T., Yu, W., Qiao, L., Liu, R., Li, S., Zhao, Y., Yang, S., & Chen, A. (2020). Determination of content of camel milk in adulterated milk samples by normalized real-time polymerase chain reaction system based on single-copy nuclear genes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(8), 3465–3470. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10382>