

УДК 637.068

Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции

Е. А. Юрова, Н. А. Жижин, С. А. Фильчакова*

*Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва, Россия;
e-mail: s_filchakova@vniimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6563-9700>

Информация о статье Реферат

Поступила в редакцию
06.05.2020;

получена
после доработки
08.08.2020

Ключевые слова:

молоко,
молочная продукция,
мясная продукция,
рыбная продукция,
молекулярно-
генетические методы
исследования

В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Методы исследования белков включают в себя иммунологические, электрофоретические и хроматографические. Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью их структуры по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей. Приведены результаты исследований по оценке методических подходов по применению метода ПЦР (полимеразная цепная реакция) диагностики для идентификации состава пищевой продукции и возможности их использования для контроля молочной продукции. Объектами исследований были образцы молока коровьего, козьего, овечьего, а также смешанные в различных соотношениях образцы молока разных видов животных. Экстракцию ДНК из образцов молока проводили по унифицированной методике для разделения молекул ДНК в молоке и молочных продуктах. В работе также рассмотрена возможность применения метода ПЦР диагностики для идентификации сырьевого происхождения продукта. Для оценки методик измерений применялись искусственно созданные образцы молока-сырья, представляющие собой коровье, козье и овечье молоко, микс из трех видов молока в различных соотношениях. В результате исследований в качестве основного метода выбран метод ПЦР в реальном времени (real time PCR), обладающий надежностью, высокой чувствительностью, достаточной экспрессностью, с возможностью его использования для молочных многокомпонентных продуктов со сложной структурной матрицей, а также для продуктов, прошедших глубокую технологическую обработку.

Для цитирования

Юрова Е. А. и др. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции. Вестник МГТУ. 2020. Т. 23, № 3. С. 214–223. DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-214-223.

Molecular genetic methods of analysis to identify the species affiliation of the raw material composition in food products

Elena A. Yurova, Nikolay A. Zhizhin, Svetlana A. Filchakova*

*All-Russian Dairy Research Institute, Moscow, Russia;
e-mail: s_filchakova@vniimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6563-9700>

Article info

Abstract

Received
06.05.2020;

received in revised
08.08.2020

Key words:

milk,
dairy products,
meat products,
fish products,
molecular genetic
research methods

Methods based on the analysis of proteins and DNA molecules are more and more used to assess the composition of food products. Proteins research methods include immunological, electrophoretic and chromatographic ones. The analysis of DNA molecules is most often used to identify the species affiliation of food components. This is due to the stability of their structure compared to proteins, as well as their presence in most biological tissues. The results of studies evaluating methodological approaches for the application of the PCR diagnostic method to identify the composition of food products and the possibility of their use for monitoring dairy products have been shown. The objects of research were samples of cow, goat, sheep milk, as well as milk samples of different animal species mixed in various ratios. DNA was extracted from milk samples according to a unified technique for the separation of DNA molecules in milk and dairy products. The work also considers the possibility of using the PCR diagnostic method to identify the raw material origin of the product. To evaluate the measurement methods, artificially created samples of raw milk were used, which were cow, goat and sheep milk, a mix of three types of milk in different ratios. As a result of the research, the main method has been chosen as the real time PCR method, which has reliability, high sensitivity, sufficient rapidity, with the possibility of using it for dairy multicomponent products with a complex structural matrix, as well as products that have undergone deep technological processing.

For citation

Yurova, E. A. et al. 2020. Molecular genetic methods of analysis to identify the species affiliation of the raw material composition in food products. *Vestnik of MSTU*, 23(3), pp. 214–223. (In Russ.) DOI: 10.21443/1560-9278-2020-23-3-214-223.

Введение

В последнее время маркировка продукции имеет решающее значение для осведомленности потребителя о составе пищевой продукции. Неверно указанная информация о составе продукта или его свойствах, а также заведомо ложная информация о наименовании товара и его компонентах может привести к негативным последствиям в отношении здоровья потребителей. Это может быть связано, например, с наличием пищевой аллергии на определенные компоненты животного и растительного происхождения, входящие в состав продукции.

Данные обстоятельства подтверждают необходимость проведения исследований состава продукта с применением молекулярно-генетических методов анализа на предмет идентификации и отсутствия незаявленных компонентов, таких как аллергены, ГМО и прочие возможные составляющие пищевой продукции.

В настоящее время все более активно для оценки состава пищевой продукции применяют методы, основанные на анализе белков и молекул ДНК. Применяемые методы исследования белков включают в себя иммунологические (Haza et al., 1999), электрофоретические и хроматографические методы (Ferreira et al., 2003). Анализ молекул ДНК применяется наиболее часто для идентификации видовой принадлежности компонентов пищевых продуктов. Это связано со стабильностью структуры молекул ДНК по сравнению с белками, а также их наличием в большинстве биологических тканей, что делает анализ молекул ДНК для идентификации компонентов в продуктах питания хорошей альтернативой анализу состава белков (Gachet et al., 1999).

Методы, основанные на анализе ДНК, в большинстве своем состоят из специфических амплификаций одного или нескольких фрагментов ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Применение полимеразной цепной реакции имеет широкий потенциал в связи с высокой чувствительностью, быстротой и простотой проведения анализа (Miraglia et al., 2004). Данные особенности метода позволили довольно широко использовать его для анализа микробиологических показателей, когда методы классической микробиологии не позволяют проводить идентификацию на уровне отдельных молекул.

Преимущества метода ПЦР анализа кроются в его особенностях, принцип основан на гибридизации и синтезе специфических олигонуклеотидов (праймеров) с последующей детекцией методом гель-электрофореза на агарозном геле. Применение данного подхода является самым простым способом оценки видовой составляющей компонентов пищевых продуктов (Saiki et al., 1985).

Значительное развитие метода ПЦР диагностики привело к разработке методических подходов к их применению. В качестве дополнительных методов подтверждения и анализа фрагментов ДНК могут быть использованы следующие методы анализа:

- полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) – способ исследования геномной ДНК путем фрагментирования ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов с использованием метода гель-электрофореза (Lockey et al., 2000);

- однонитевой конформационный полиморфизм (PCR-SSCP) – после денатурации одноцепочечная ДНК претерпевает трехмерное свертывание и может принимать уникальное конформационное состояние на основе своей последовательности ДНК. Различие в форме между двумя одноцепочечными цепями ДНК с разными последовательностями вызывает их различную миграцию на агарозном геле, даже если количество нуклеотидов одинаково;

- случайно амплифицируемая полиморфная ДНК (PCR-RAPD) – используется как одиночный праймер, так и несколько RAPD-праймеров. Продукт RAPD образуется в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированной инвертированной последовательностью используемого праймера. Метод универсален для исследований разных видов, при использовании одних и тех же праймеров. Как правило, праймер, выявляющий высокий полиморфизм для одного вида, будет эффективен и для других видов (Lockey et al., 2000);

- повторы последовательностей (PCR-SSR) – являются очень эффективным молекулярным маркером в популяционной генетике, картировании генома, таксономических исследованиях и других крупномасштабных исследованиях. Данный способ ПЦР с фланкирующими праймерами к короткому мини- или микросателлитному повтору позволяет выявлять маркеры с кодоминантным наследованием и, соответственно, удобен для выявления гетерозигот по данному локусу (Lockey et al., 2000);

- мультиплексная полимеразная цепная реакция (Multiplex PCR) относится к использованию полимеразной цепной реакции для амплификации нескольких различных последовательностей ДНК одновременно.

Приведенные выше молекулярно-генетические методы можно разделить на две крупные составляющие: количественный конкурентный ПЦР и ПЦР в реальном времени (real time PCR) с возможностью использования специальных зондов или меченых праймеров (Zimmermann et al., 1996).

ПЦР в реальном времени позволяет проводить одновременное обнаружение и подтверждение выделенных фрагментов, что повышает надежность применения методики измерений для анализа пищевых продуктов. Необходимость в идентификации видовой состава молочной продукции явилась отправной точкой к применению методов молекулярно-генетического анализа с последующей

разработкой методик измерений, базирующихся на принципах ПЦР диагностики, но с учетом всех достоинств и недостатков метода. В настоящее время методы ПЦР диагностики уже успешно применяются для определения видового состава мясной и рыбной продукции, а также пивоваренной продукции (Lockey et al., 2000; Oganasyants et al., 2019).

Целью данной статьи является обобщение анализа литературных данных, нормативно-методических документов по оценке методических подходов по применению метода ПЦР диагностики для идентификации пищевой продукции и разработки способов использования количественной конкурентной ПЦР и ПЦР в реальном времени (real time PCR) для контроля состава молочной продукции, в том числе и видового.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись образцы молока коровьего, козьего, овечьего, а также смешанные в различных соотношениях образцы молока разных видов животных. При подготовке проб к измерению учитывали содержание массовой доли жира.

Для экстракции ДНК из образцов молока использовали принципы и подходы, описанные в литературе (Ахметов и др., 2009; Бигаева и др., 2019а): 10 г исследуемого образца подвергали центрифугированию при 5000 об/мин при температуре 4 °С. Далее верхний надосадочный слой удаляли. Осадок дважды промывали объемом 500 мкл PBS (рН 7,4) и дважды осуществляли промывку дистиллированной водой объемом 500 мкл. Далее еще раз центрифугировали в центрифужной пробирке вместимостью 1,5 мл в течение 10 мин при 10000 об/мин при 4 °С. К осадку для экстрагирования добавляли 350 мкл буфера (рН 8,0, 100 мМ Трис Cl, 100 мМ NaCl и 5 мМ ЭДТА), 50 мкл 20%-го раствора SDS и 10 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Эту смесь затем инкубировали при 55 °С в течение 4 ч. После чего добавляли равный объем трис-фенола, смесь перемешивали на вортексе в течение 1 мин и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и 4 °С. Полученный супернатант экстрагировали смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 24 : 25 : 1 и дважды с равным объемом смеси хлороформ : изоамиловый спирт в соотношении 25 : 1. Далее проводили процедуру осаждения ДНК ледяным абсолютным этанолом и впоследствии проводили промывку смесью этанол : вода (7 : 3). Полученную ДНК растворяли в 25 мкл трис-ЭДТА до значения рН, равным 8,0.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК контролировали по поглощению при длине волны 260 и 280 нм с использованием сканирующего спектрофотометра Biowave II (Великобритания).

Целостность ДНК оценивали посредством электрофореза в 1%-м агарозном геле в электрофорезной горизонтальной камере Mini-Sub Cell GT System производства фирмы Bio-Rad (США) в течение 40 мин при 100 V. Оценка геля проводилась при ультрафиолетовом излучении посредством геледокументирования на оборудовании EC3 Imaging System.

Результаты и обсуждение

На начальной стадии подготовки к выполнению работы провели анализ литературных источников и государственных стандартов, который позволил определить возможность использования метода ПЦР диагностики для целей идентификации пищевой продукции. В результате было отмечено, что стандартизованных методик измерений с применением метода ПЦР анализа недостаточно. Кроме того, все эти методы, представленные в табл. 1, рассчитаны преимущественно на определение ГМО, ГМИ и новых линий ГМО 2-го поколения. При этом одной из представленных методик в сельскохозяйственной продукции можно определить видовую принадлежность содержащихся в них только мясных и растительных ингредиентов. Отсутствие стандартизованных методик измерений оценки видового состава молочной продукции выявило актуальность разработки методики идентификации сырьевого состава молока с применением метода ПЦР.

Таблица 1. Стандартизованные методы ПЦР анализа
Table 1. Standardized PCR methods

№ п/п	Наименование стандарта	Область распространения	Определяемый параметр
1	ГОСТ Р 52173-2003. Сырье и продукты пищевые. Метод идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения	Сырье и продукты пищевые	Генетически модифицированные источники (ГМИ) растительного происхождения
2	ГОСТ 31719-2012. Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)	Корма, пищевые продукты, продовольственное сырье растительного, животного происхождения, в том числе подвергавшиеся термической обработке	Видоспецифичный фрагмент ДНК животных и растений

3	ГОСТ Р 56058-2014. Корма и кормовые добавки. Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения	Корма, кормовые добавки и сырье для их производства	Генетически модифицированные организмы и полученные из них продукты
4	ГОСТ Р 53244-2008 (ИСО 21570:2005). Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот	Пищевые продукты, а также корма и растительные образцы, отобранные из окружающей среды	ГМО растительного происхождения
5	МУК 4.2.3309-15. Методы идентификации и количественного определения новых линий ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах	Продовольственное сырье и пищевые продукты	Новые линии ГМО 2-го поколения в пищевых продуктах

Рассматривая потенциал возможности методов ПЦР анализа для исследования состава пищевой продукции было установлено, что посредством ДНК анализа возможно осуществлять контроль аллергенов в пищевой продукции, в продуктах, обладающих потенциальными аллергенными свойствами. ДНК анализ позволяет определять данные компоненты на уровне пикограмм (*Poms et al., 2004*). Применение видоспецифичной ПЦР используется для выявления фундука в пищевой продукции на уровне 0,001 % (*Holzhauser et al., 2000*). Также применение ПЦР делает возможным определения аллергенов в сложных пищевых матрицах (*Poms et al., 2004*). Выявление аллергена арахиса проводится методом ПЦР в реальном времени и позволяет выявлять его наличие на уровне 0,0001 % (*Hird et al., 2003*).

В связи с высокой чувствительностью методы ПЦР все больше используются для обнаружения ДНК продуктов как растительного, так и животного происхождения, и распространяются на все более широкий круг потенциальных аллергенов.

Первые методики использования метода ПЦР для анализа ГМО были разработаны на основе количественной конкурентной ПЦР (QC-PCR) и применялись для анализа генно-модифицированной кукурузы и сои (*Hübner et al., 1999*).

В настоящее время ПЦР в реальном времени является наиболее часто используемой техникой для количественного определения ГМО. Это связано с некоторыми преимуществами метода, в частности сокращение продолжительности анализа и устранение мешающих артефактов за счет отсутствия анализа путем электрофореза в агарозном геле, а также повышенная специфичность за счет возможности использования зондов.

Валидация метода ПЦР в реальном времени обеспечивается посредством сертифицированных образцов генно-модифицированных компонентов. В связи с этим для решения данного вопроса разработаны коммерческие наборы, содержащие все необходимые компоненты для проведения анализа по выявлению ГМО в различных пищевых матрицах (*Hardegger et al., 1999*).

Наиболее часто выявляемой фальсификацией, например, в мясной продукции является наличие свиного или куриного мяса в продуктах, выработанных из говядины. Для определения в говяжьем фарше наличия добавления свинины в настоящее время используют несколько вариантов ПЦР анализа, приведенные в табл. 2.

Таблица 2. Методы ПЦР анализа для выявления добавления свинины в говядину
Table 2. PCR methods analysis to identify pork to beef adding

Продукт	Выявляемый вид	Метод ПЦР	Определяемый ген
Говядина	Свинина	Видоспецифичная ПЦР	Гормон роста свиньи
			125S rRNA
			Короткие вкрапления ядерных элементов (SINE)
		Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов	Гормон роста свиньи
Цитохром Б			
			Репликация Д-петли

Приведенные в табл. 2 методы полимеразной цепной реакции позволяют проводить количественную оценку внесения компонентов, несущих ДНК свиньи в количестве от 0,1 % и выше. Данный метод за счет своей высокой специфичности позволяет выявлять даже следовые количества свинины.

Методы ПЦР применяются и для анализа мясной продукции, прошедшей термическую обработку. Разработанные методики позволяют одновременно определять до четырех видов животных компонентов в составе продукта. Определяемые виды, а также целевые гены, по которым проводится анализ мясной продукции, представлены в табл. 3.

Таблица 3. Методы ПЦР для мясной продукции, прошедшей термическую обработку
Table 3. PCR methods for heat-treated meat products

Выявляемый вид	Метод ПЦР	Определяемый ген
Крупный рогатый скот; свинья; курица; овца; коза; конины; буйвол; индейка	Мультиплексная полимеразная цепная реакция	5S rDNA
		Цитохром Б
	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов	Цитохром Б
	Видоспецифичная ПЦР	Альфа-актин
		125S rRNA
		Микросателлиты ДНК
		Цитохром Б
	ПЦР в реальном времени	125S rRNA
		Цитохром Б
		18S rRNA
		ND6
		Миостатин
Рианодин		
Фосфодиэстераза		

Применение комплекса аналитических методов, основанных на полимеразной цепной реакции, делает возможным проводить аутентификацию мясной продукции по видовому составу с учетом различных вариантов технологической обработки (*Meyer et al., 1994; 1995*), что позволяет комплексно подойти к решению вопроса идентификации состава. Возможность оценки структуры продукта, прошедшего технологическую обработку с применением метода ПЦР анализа, способствует изучению состава молочной продукции в случае, если сложность матрицы не позволяет применять хроматографические методы.

Интересен подход к идентификации и при исследовании рыбной продукции. Определение видового состава рыбной продукции обычно ведется классическими методами по морфологическим признакам. Но при анализе рыбной продукции с искаженными морфологическими признаками вследствие влияния технологической обработки дать однозначный ответ на видовое происхождение примененных компонентов нельзя. В этом случае для определения состава рыбной продукции используются методы ПЦР (*Comi et al., 2005*). Обобщенные данные по применению ПЦР анализа рыбной продукции представлены в табл. 4.

Таблица 4. Методы ПЦР для аутентификации продукции рыбных производств
Table 4. PCR methods for fish products authentication

Вид переработки сырья	Метод ПЦР	Определяемый ген
Сырая рыба; копченые; термообработка; маринад; консервирование; заморозка	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов	Цитохром Б
		125S rRNA
		Альфа-актин
		16S rRNA
	Однонитевой конформационный полиморфизм	125S rRNA
		Цитохром Б
	Видоспецифичная ПЦР	5S rDNA
		Цитохром Б
	ПЦР в реальном времени	Трансферин
		Цитохром Б

Изучение применяемых методов ПЦР анализа рыбной продукции показало, что большинство основанных на анализе ДНК методов идентификации рыбной продукции построено на усилении митохондриальной ДНК. Для видовой идентификации чаще других используется цитохром Б (*Asensio et al., 2001; Calo-Mata et al., 2003; Hold et al., 2001*), что позволяет расширять возможности применения методик измерений.

Активно используется метод ПЦР диагностики для оценки технологических свойств молока. По данным авторов (*Ахметов и др., 2009; Бигаева и др., 2019а; 2019б; Tyulkin et al., 2019*), возможно использовать метод молекулярно-генетического анализа для оценки генотипа коров с разными генотипами каппа-казеина и влиянием генотипа каппа-казеина на сыропригодность молока и его технологические свойства.

Метод ПЦР анализа для оценки подлинности молочной продукции в настоящее время практически не применяется, в силу того, что возможности данного метода не позволяют оценить состав продукта, который включает не только молоко, но и пищевые ингредиенты и компоненты.

Вместе с тем в последнее время ассортиментный ряд молочной продукции значительно расширился, что привело к необходимости более детальной оценки состава продукта, в том числе и с учетом его аллергенности. Также появилась необходимость оценки продукта с точки зрения видовой состава сырья. Заявленный продукт, якобы выработанный из козьего молока, далеко не всегда соответствует своему наименованию. Поэтому в настоящее время фальсификацию молочной продукции можно свести к несоответствию заявленных составных частей продукта или не заявленных видов молока-сырья при производстве той или иной молочной продукции.

Анализ видовой составляющей молочного сырья необходим при производстве "чистых" продуктов, таких, например, как овечьи или козьи сыры, где достаточно часто встречается использование коровьего молока.

Посредством метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) возможно выявление примесей добавленного молока от 0,1 %, что позволяет с высокой точностью определять видовую специфичность даже в условиях "осложненной" различными технологическими факторами матрицы продукта (*Bania et al., 2001*). Некоторые методы ПЦР анализа для проведения аутентификации молочной продукции представлены в табл. 5.

Таблица 5. Применение ПЦР для аутентификации молочной продукции
Table 5. PCR for the dairy products authentication

Молочный продукт	Определяемый вид	Метод ПЦР	Определяемый ген
Молоко-сырье	Корова, овца, коза, буйвол	Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов	β -казеин
Молоко, прошедшее термическую обработку	Корова, овца, коза, буйвол	Видоспецифичная ПЦР / ПЦР в реальном времени	125S rRNA
Козье молоко	Корова, овца	Видоспецифичная ПЦР	Репликация Д-петли
		Мультиплексная полимеразная цепная реакция	125S rRNA
Овечье молоко	Овца, коза	Видоспецифичная ПЦР	125S rRNA
		Мультиплексная полимеразная цепная реакция	125S rRNA/16S rRNA

Разработки в области аутентификации молочной продукции позволили проводить идентификацию четырех видов сельскохозяйственных животных (корова, овца, коза, буйвол), представляющих наибольший интерес в молочной промышленности (*Plath et al., 1997*). Возможен анализ видовой составляющей молочных продуктов, прошедших технологическую обработку, в том числе и термическую. Так, например, применение метода ПЦР анализа, основанного на полиморфизме длин рестрикционных фрагментов, позволяет проводить выявление биологического происхождения основного молочного белка казеина, включая казеинаты, использующиеся в молочной промышленности в качестве ингредиентов (*De la Fuente et al., 2005*).

Оценка применяемых методов ПЦР диагностики позволила разработать методические подходы для идентификации сырьевого происхождения продукта. Определены основные подходы к подготовке пробы с учетом состава продукта и степени его обработки. Для достоверности оценки методических подходов применялись искусственно созданные образцы молока-сырья, представляющие собой молоко коровье, молоко козье и молоко овечье, микс из трех видов молока в различных соотношениях, микс из коровьего и козьего молока в соотношении 98 : 2, микс из козьего и коровьего молока в соотношении 98 : 2. Оценочные результаты показали, что потребуются разработать основные подходы к возможности использования нескольких методов ПЦР анализа одновременно.

Оценка полученных результатов показала, что наиболее оптимально использовать метод количественной конкурентной ПЦР и ПЦР в реальном времени (real time PCR) в совокупности. Для дальнейшей разработки методики измерений необходимо будет оценить влияние различных факторов, к которым относится технология переработки, включая термическую обработку, процесс сквашивания, состав заквасочной культуры, так как выявленная высокая специфичность метода может приводить к получению ложноположительных результатов.

Заключение

Проведенные исследования позволили оценить возможности метода ПЦР диагностики с учетом дополнительных методов подтверждения и анализа фрагментов ДНК. Полученные оценки используемых методик измерений позволили сделать вывод, что метод ПЦР диагностики имеет высокий потенциал для использования в целях идентификации молочной продукции. В качестве основного метода исследования был выбран метод ПЦР в реальном времени (real time PCR), который обладает необходимой надежностью, высокой чувствительностью, экспрессностью, с возможностью использования данного метода для молочных многокомпонентных продуктов со сложной структурной матрицей, а также продуктов, прошедших глубокую технологическую обработку. Последующая разработка методики измерений позволит осуществлять идентификацию молочной продукции не только по видовому составу применяемого сырья, но и по составу применяемых компонентов, что наиболее важно для обеспечения безопасности молочной продукции.

Библиографический список

- Ахметов Т. М., Тюлькин С. В., Зарипов О. Г., Валиуллина Э. Ф. [и др.]. Качество и технологические свойства сыра, изготовленного из молока коров с разными генотипами каппа-казеина // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. 2009. № 1(1). С. 20–23.
- Бигаева А. В., Гильманов Х. Х., Тюлькин С. В., Вафин Р. Р. [и др.]. Сыропригодность молока коров с разными генотипами каппа-казеина // Сыроделие и маслоделие. 2019а. № 6. С. 26–27. DOI: 10.31515/2073-4018-2019-6-26-27.
- Бигаева А. В., Гильманов Х. Х., Тюлькин С. В., Галстян А. Г. [и др.]. Термоустойчивость молока коров с разными генотипами каппа-казеина // Пищевая промышленность. 2019б. № 10. С. 59–61. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10159.
- Asensio L., González I., Fernández A., Rodríguez M. A. [et al.]. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. Vol. 49, Iss. 4. P. 1720–1723. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf001185w>.
- Bania J., Ugorski M., Polanowski A., Adamczyk E. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow // Journal of Dairy Research. 2001. Vol. 68, Iss. 2. P. 333–336. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029901004708>.
- Calo-Mata P., Sotelo C. G., Perez-Martin R. I., Rehbein H. [et al.]. Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques // European Food Research and Technology. 2003. Vol. 217. P. 259–264. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0735-y>.
- Comi G., Iacumin L., Rantsiou K., Cantoni C. [et al.]. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds // Food Control. 2005. Vol. 16, Iss. 1. P. 37–42. DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.11.003.
- De la Fuente M. A., Juárez M. Authenticity assessment of dairy products // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005. Vol. 45, Iss. 7–8. P. 563–585. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408690490478127>.
- Ferreira I. M. P. L. V. O., Caçote H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins // Journal of Chromatography A. 2003. Vol. 1015, Iss. 1–2. P. 111–118. DOI: 10.1016/s0021-9673(03)01261-5.
- Gachet E., Martin G. G., Vigneau F., Meer G. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available // Trends in Food Science & Technology. 1999. Vol. 9, Iss. 11–12. P. 380–388. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00002-3).
- Hardegger M., Brodmann P., Herrmann A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR // European Food Research and Technology. 1999. Vol. 209. P. 83–87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170050462>.
- Haza A. I., Molares P., Martín R., García T. [et al.]. Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats // Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999. Vol. 79, Iss. 7. P. 1043–1047. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1043::AID-JSFA326>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1043::AID-JSFA326>3.0.CO;2-5).

- Hird H., Lloyd J., Goodicr R., Brown J. [et al.]. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction // *European Food Research and Technology*. 2003. Vol. 217. P. 265–268. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0726-z>.
- Hold G. L., Russell V. J., Pryde S. E., Rehbein H. [et al.]. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products // *European Food Research and Technology*. 2001. Vol. 212. P. 385–389. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170000237>.
- Holzhauser T., Wangorsch A., Vieths S. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes // *European Food Research and Technology*. 2000. Vol. 211. P. 360–365. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170000152>.
- Hübner P., Studer E., Lüthy J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food // *Food Control*. 1999. Vol. 10, Iss. 6. P. 353–358. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00074-2).
- Lockey A. K., Bardsley R. G. DNA-based methods for food authentication // *Trends in Food Science & Technology*. 2000. Vol. 11, Iss. 2. P. 67–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2).
- Meyer R., Candrian U., Lüthy J. Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction // *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1994. Vol. 77, Iss. 3. P. 617–622. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.3.617>.
- Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food // *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1995. Vol. 78, Iss. 6. P. 1542–1551. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.6.1542>.
- Miraglia M., Berdal K. G., Brera C., Corbisier P. [et al.]. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain // *Food and Chemical Toxicology*. 2004. Vol. 42, Iss. 7. P. 1157–1180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.02.018>.
- Oganesyants L., Vafin R., Galstyan A., Ryabova A. [et al.]. DNA authentication of brewery products: Basic principles and methodological approaches // *Foods and Raw Materials*. 2019. Vol. 7, Iss. 2. P. 364–374. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-364-374>.
- Plath A., Krause I., Einspanier R. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques // *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1997. Vol. 205. P. 437–441. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170050195>.
- Poms R. E., Klein C. L., Anklam E. Methods for allergen analysis in food: A review // *Food Additives & Contaminants*. 2004. Vol. 21, Iss. 1. P. 1–31. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030310001620423>.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B. [et al.]. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*. 1985. Vol. 230, Iss. 4732. P. 1350–1354. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2999980>.
- Tyulkin S. V., Vafin R. R., Gilmanov Kh. Kh., Rzhanova I. V. [et al.]. DNA markers – a prediction criterion for yield and quality of raw milk // *Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Сер. геологии и технических наук*. 2019. Т. 6, № 438. С. 177–183. DOI: 10.32014/2019.2518-170X.168.
- Zimmermann K., Mannhalter J. W. Technical aspects of quantitative competitive PCR // *BioTechniques*. 1996. Vol. 21, Iss. 2. P. 268–279. DOI: <https://doi.org/10.2144/96212rv01>.

References

- Akhmetov, T. M., Tjulkin, S. V., Zaripov, O. G., Valiullina, E. F. et al. 2009. Quality and technological properties of the cheese made from milk of cows with different genotypes of kappa-casein. *Actual Questions of Veterinary Biology*, 1(1), pp. 20–23. (In Russ.)
- Bigaeva, A. V., Gilmanov, Kh. Kh., Tyulkin, S. V., Vafin, R. R. et al. 2019a. Cheese-making of cows' milk with different of kappa-casein genotypes. *Cheesemaking and buttermaking*, 6, pp. 26–27. DOI: 10.31515/2073-4018-2019-6-26-27. (In Russ.)
- Bigaeva, A. V., Gilmanov, Kh. Kh., Tyulkin S. V., Galstyan A. G. et al. 2019b. Heat resistance of cows' milk with different of kappa-casein genotypes. *Food Industry*, 10, pp. 59–61. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10159. (In Russ.)
- Asensio, L., González, I., Fernández, A., Rodríguez, M. A. et al. 2001. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), pp. 1720–1723. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf001185w>.
- Bania, J., Ugorski, M., Polanowski, A., Adamczyk, E. 2001. Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *Journal of Dairy Research*, 68(2), pp. 333–336. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029901004708>.
- Calo-Mata, P., Sotelo, C. G., Perez-Martin, R. I., Rehbein, H. et al. 2003. Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *European Food Research and Technology*, 217, pp. 259–264. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0735-y>.

- Comi, G., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cantoni, C. et al. 2005. Molecular methods for the differentiation of species used in production of cod-fish can detect commercial frauds. *Food Control*, 16(1), pp. 37–42. DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.11.003.
- De la Fuente, M. A., Juárez, M. 2005. Authenticity assessment of dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7–8), pp. 563–585. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408690490478127>.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Caçote, H. 2003. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1015(1–2), pp. 111–118. DOI: 10.1016/s0021-9673(03)01261-5.
- Gachet, E., Martin, G. G., Vigneau, F., Meer, G. 1999. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology*, 9(11–12), pp. 380–388. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00002-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00002-3).
- Hardegger, M., Brodmann, P., Herrmann, A. 1999. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research and Technology*, 209, pp. 83–87. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170050462>.
- Haza, A. I., Molares, P., Martín, R., García, T. et al. 1999. Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(7), pp. 1043–1047. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1043::AID-JSFA326>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1043::AID-JSFA326>3.0.CO;2-5).
- Hird, H., Lloyd, J., Goodicr, R., Brown, J. et al. 2003. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *European Food Research and Technology*, 217, pp. 265–268. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0726-z>.
- Hold, G. L., Russell, V. J., Pryde, S. E., Rehbein, H. et al. 2001. Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *European Food Research and Technology*, 212, pp. 385–389. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170000237>.
- Holzhauser, T., Wangorsch, A., Vieths, S. 2000. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *European Food Research and Technology*, 211, pp. 360–365. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170000152>.
- Hübner, P., Studer, E., Lüthy, J. 1999. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, 10(6), pp. 353–358. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00074-2).
- Lockey, A. K., Bardsley, R. G. 2000. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), pp. 67–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2).
- Meyer, R., Candrian, U., Lüthy, J. 1994. Detection of Pork in Heated Meat Products by the Polymerase Chain Reaction. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 77(3), pp. 617–622. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.3.617>.
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 78(6), pp. 1542–1551. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/78.6.1542>.
- Miraglia, M., Berdal, K. G., Brera, C., Corbisier, P. et al. 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42(7), pp. 1157–1180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.02.018>.
- Oganesyants, L., Vafin, R., Galstyan, A., Ryabova, A. et al. 2019. DNA authentication of brewery products: Basic principles and methodological approaches. *Foods and Raw Materials*, 7(2), pp. 364–374. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-364-374>.
- Plath, A., Krause, I., Einspanier, R. 1997. Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 205, pp. 437–441. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002170050195>.
- Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: A review. *Food Additives & Contaminants*, 21(1), pp. 1–31. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030310001620423>.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B. et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), pp. 1350–1354. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2999980>.
- Tyulkin, S. V., Vafin, R. R., Gilmanov, Kh. Kh., Rzhanova, I. V. et al. 2019. DNA markers – a prediction criterion for yield and quality of raw milk. *Izvestia National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. A series of geology and technical sciences*, 6(438), pp. 177–183. DOI: 10.32014/2019.2518-170X.168.
- Zimmermann, K., Mannhalter, J. W. 1996. Technical Aspects of Quantitative Competitive PCR. *BioTechniques*, 21(2), pp. 268–279. DOI: <https://doi.org/10.2144/96212rv01>.

Сведения об авторах

Юрова Елена Анатольевна – ул. Люсиновская, 35, корп. 7, г. Москва, Россия, 115093; Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, канд. техн. наук;
e-mail: e_yurova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3369-5673>

Elena A. Yurova – 35, Lyusinovskaya Str., blok 7, Moscow, Russia, 115093; All-Russian Dairy Research Institute, Cand. Sci. (Engineering); e-mail: e_yurova@vnimi.org,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3369-5673>

Жижин Николай Анатольевич – ул. Люсиновская, 35, корп. 7, г. Москва, Россия, 115093;
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, науч. сотрудник;
e-mail: n_zhizhin@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0876-8968>

Nikolay A. Zhizhin – 35, Lyusinovskaya Str., blok 7, Moscow, Russia, 115093; All-Russian Dairy Research Institute, Scientific Employee; e-mail: n_zhizhin@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0876-8968>

Фильчакова Светлана Анатольевна – ул. Люсиновская, 35, корп. 7, г. Москва, Россия, 115093;
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, канд. техн. наук,
доцент, науч. сотрудник; e-mail: s_filchakova@vnimi.org, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6563-9700>

Svetlana A. Filchakova – 35, Lyusinovskaya Str., blok 7, Moscow, Russia, 115093; All-Russian Dairy Research Institute, Cand. Sci. (Engineering), Scientific Employee; e-mail: s_filchakova@vnimi.org,
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6563-9700>