

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР-АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

Е.А. ЮРОВА, С.А. ФИЛЬЧАКОВА, Н.А. ЖИЖИН

(ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
молочной промышленности»)

Необходимость повышения качества и точности выполнения измерений состава и свойств молока и молочных продуктов приводит к расширению использования методов современного анализа включая методы молекулярно-генетического исследования. Использование метода ПЦР-анализа для идентификации видового состава молочной продукции является наиболее перспективным. В статье рассмотрена возможность разработки методики измерений для оценки состава и свойств молока и молочных продуктов с применением молекулярно-генетических методов анализа (ПЦР, ПЦР-ПДРФ, секвенирование). Оценка чувствительности метода и его метрологических характеристик позволила определить наиболее подходящий способ исследований.

Ключевые слова: молоко, молочная продукция, молекулярно-генетические методы исследования (ПЦР, ПЦР-ПДРФ, секвенирование).

Введение

Решение проблемы фальсификации пищевых продуктов, в частности, молочной продукции, в контексте безопасности и добросовестной торговли пищевыми продуктами является наиболее актуальным. Не случайно основным на 31-й сессии Координационного комитета ФАО/ВОЗ по Европе в сентябре-октябре 2019 г. стал вопрос «Фальсификация пищевой продукции: устранение рисков, предотвращение и противодействие». При его обсуждении подчеркивалось, что «Фальсификация пищевой продукции – это глобальная транснациональная проблема, которая отражается на местном агропродовольственном хозяйстве, здоровье и доверии потребителей», в связи с чем «...для борьбы с фальсификацией пищевых продуктов и обеспечения их целостности необходимы многосторонние, междисциплинарные, транснациональные подходы» [1].

Согласно резолюции ФАО/ВОЗ по Европе для обеспечения определения подлинности продукции необходимы надежные системы обеспечения безопасности пищевых продуктов, в которые входят комплексная, основанная на научных данных нормативно-правовая база, на анализе рисков систем контроля пищевых продуктов, эффективные диагностические методы анализа и лабораторный потенциал [1].

В настоящее время насущной является потребность в идентификации молочной продукции, выработанной из молока различных сельскохозяйственных животных или из их смеси. При этом методы оценки состава такой группы продукции отсутствуют, что не позволяет достоверно оценить состав и свойства молочных продуктов, тем более это, как правило, продукты с добавленной стоимостью [2]. Разработка современных высокоэффективных методов оценки позволит не только решить

вопрос определения показателей идентификации, но и осуществить комплексный анализ с учетом состава и свойств продукта.

Существующие молекулярные методы (электрофорез, иммуноферментный и хроматографический анализы) малоприменимы в этой области исследований ввиду частичной денатурации целевого компонента – белка [3–5]. Объективная оценка качества и идентификации молочных продуктов и их безопасность возможны только на основании данных, полученных на основе новых принципов и методологий, в результате практических и экспертно-аналитических решений [6–8].

В последнее время молекулы ДНК стали целевыми соединениями для идентификации различных объектов исследований при использовании методов анализа на основе ПЦР, так как они термически более стабильны, чем липиды и белки. Таким образом, методы на основе ПЦР могут быть применимы для идентификации козьего молока в пищевых продуктах, и они позволят обнаружить весьма небольшое количество коровьего молока в козьем молоке. Обычная ПЦР диагностика, однако, не может использоваться в качестве точного количественного инструмента для идентификации молока [9]. Поэтому методики ПЦР в реальном времени в качестве количественного инструмента для аутентификации молочных продуктов применяются все чаще, и этот метод используется для устранения ложноположительных результатов обычной ПЦР, для уменьшения загрязнения исследуемых образцов и повышения надежности результатов измерений [9–11].

Применение системы детекции результатов ПЦР в режиме «реального времени» наряду с ответом на вопрос о наличии или отсутствии в исследуемом образце мишени (примеси) позволяет оценить его количество даже на минимальном уровне [12].

В таблице 1 представлены сравнительные характеристики методов обнаружения (детекции) результатов ПЦР.

Таблица 1

Сравнительные характеристики методов обнаружения результатов ПЦР [12]

Процедура измерений	Электрофорез	ГиФА	Система «FLASH» и флуориметр «Джин»	Система детекции результатов ПЦР в режиме реального времени (Real Time PCR)
Приблизительное время детекции для 30 образцов	40 мин	60 мин	3 мин	40 мин
Контаминация продуктами ПЦР	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая
Фиксирование данных	Вручную	Автоматическое	Автоматическое	Автоматическое
Особенность	Возможность увидеть результат ПЦР в виде полоски на геле, оценить количество и качество амплификата по нескольким параметрам	Повышение достоверности исследования за счет специфичности пробы к целевому амплификату	Повышение достоверности исследования за счет специфичности пробы к целевому амплификату	Возможность оценки исходного количества копий ДНК в образце

Современные компьютерные программы в комбинации с применением флуоресцентно меченных гибридизационных олигонуклеотидных проб для визуализации

результатов ПЦР (методы FLASH или ПЦР «в реальном времени») позволяют практически полностью исключить неверную трактовку результатов измерений, что способствует использованию ПЦР в режиме «реального времени» для дальнейших исследований [12].

Цель проводимых исследований – определение молекулярно-генетических способов идентификации видовой принадлежности молока и сырьевого состава молочной продукции.

Методика исследований

Объектами исследований являлись образцы молока коровьего, козьего, овечьего, а также смешанные в различных соотношениях образцы молока разных видов сельскохозяйственных животных. При подготовке проб к измерению учитывали содержание массовой доли жира в молоке для исключения влияния на чистоту анализируемой пробы.

Для экстракции ДНК из образцов молока использовали принципы и подходы, описанные в литературе, в том числе авторами статьи [6, 7].

Протоколы применения метода ПЦР для видовой идентификации молока по *CSN3*-гена приведены в таблице 2.

Таблица 2

ПЦРФ-протоколы для видовой идентификации молока по *CSN3*-гену

XbaI-ПЦРФ						
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	2 пробы, мкл	5 проб, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			7,8	15,6	39	78
SE-буфер В	10×	1×	2	4	10	20
XbaI	20 U	4 U	0,2	0,4	1	2
ПЦР-проба			10			
ИТОГО			20			
Инкубация при 37°C в течение ночи ПЦРФ-фрагменты: 223/127 bp (корова); 356 bp (коза); 351 bp (овца)						
PsiI-ПЦРФ						
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	2 пробы, мкл	5 проб, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			7,8	15,6	39	78
SE-буфер В	10×	1×	2	4	10	20
PsiI	5 U	1 U	0,2	0,4	1	2
ПЦР-проба			10			
ИТОГО			20			
Инкубация при 37°C в течение ночи ПЦРФ-фрагменты: 350 bp (корова); 356 bp (коза); 285/66 bp (овца)						

RsaI-ПДРФ						
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	2 пробы, мкл	5 проб, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			7,8	15,6	39	78
SE-буфер В	10×	1×	2	4	10	20
RsaI	20 U	4 U	0,2	0,4	1	2
ПЦР-проба			10			
ИТОГО			20			
Инкубация при 37°C в течение ночи ПДРФ-фрагменты: 262/88 bp (корова); 262/87/7 bp (коза); 257/87/7 bp (овца)						
XbaI-PsiI-ПДРФ						
Реагент	Исходная концентрация	Рабочая концентрация	1 проба, мкл	2 пробы, мкл	5 проб, мкл	10 проб, мкл
dH ₂ O			7,6	15,2	38	76
SE-буфер В	10×	1×	2	4	10	20
XbaI	20 U	4 U	0,2	0,4	1	2
PsiI	5 U	1 U	0,2	0,4	1	2
ПЦР-проба			10			
ИТОГО			20			
Инкубация при 37°C в течение ночи ПЦРФ-фрагменты: 223/127 bp (корова); 356 bp (коза); 285/66 bp (овца)						

Результаты и обсуждение

Оценка идентификации молока сырья жвачных животных проводилась по амплифицируемым праймерами JK5 и JK3 референсных нуклеотидных последовательностей ДНК локуса CSN3-гена. Для достижения цели были использованы нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank.

Для достоверности оценки методических подходов применялись искусственно созданные образцы молока сырья, представлявшие собой молоко коровье, молоко козы и молоко овчье. Результаты исследований показали, что потребуется разработать основные подходы к возможности использования нескольких методов ПЦР-анализа одновременно.

Для оценки возможности используемой методики для идентификации видовой принадлежности молочного сырья были получены CSN3-ПЦР-ПДРФ-профили праймеров коровьего, козьего и овечьего молока. Для изучения наиболее оптимального варианта идентификации молока разных сельскохозяйственных животных были использованы три варианта рестриктаз: *XbaI*, *PsiI* и *RsaI*. Полученные данные

по рестрикционному картированию амплифицируемых с праймерами JK5 и JK3 референсных нуклеотидных последовательностей ДНК локуса CSN3-гена сельскохозяйственных животных приведены на рисунках 1–3.

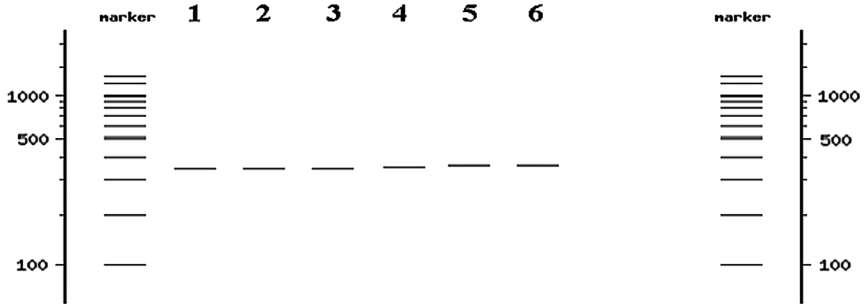


Рис. 1. CSN3-ПЦР-ПДРФ-профиль (видовой) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *XbaI*):
 1 – ПЦР-продукт *Bos taurus* (корова) (350 bp); 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* (корова) (350 bp);
 3 – ПЦР-продукт *Capra hircus* (коза) (356 bp); 4 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* (коза) (356 bp);
 5 – ПЦР-продукт *Ovis aries* (овца) (351 bp); 6 – ПДРФ-фрагмент *Ovis aries* (овца) (351 bp)

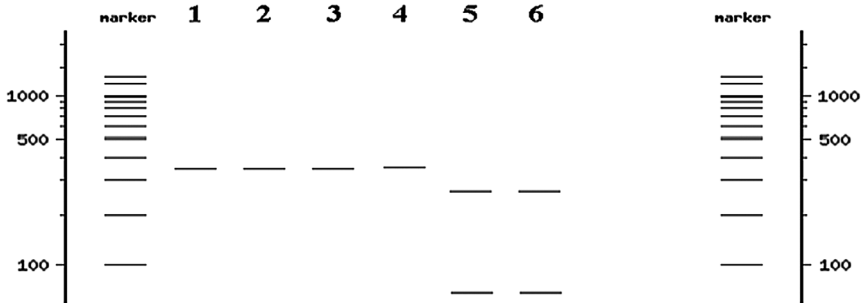


Рис. 2. CSN3-ПЦР-ПДРФ-профиль (видовой) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *PsiI*):
 1 – ПЦР-продукт *Bos taurus* (корова) (350 bp); 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* (корова) (223/127 bp);
 3 – ПЦР-продукт *Capra hircus* (коза) (356 bp); 4 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* (коза) (356 bp);
 5 – ПЦР-продукт *Ovis aries* (овца) (285/66 bp); 6 – ПДРФ-фрагмент *Ovis aries* (овца) (285/66 bp)

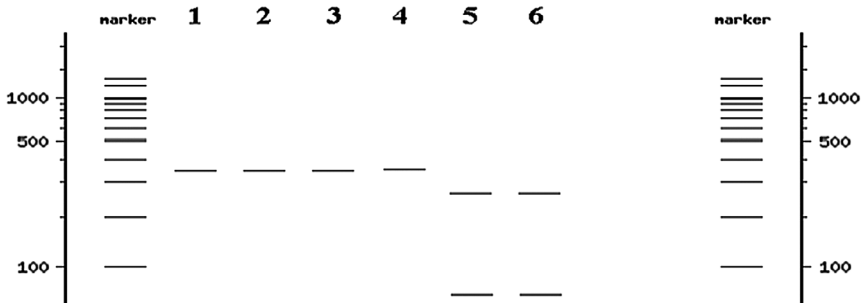


Рис. 3. CSN3-ПЦР-ПДРФ-профиль (видовой) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *RsaI*):
 1 – ПЦР-продукт *Bos taurus* (корова) (350 bp); 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* (корова) (223/127 bp);
 3 – ПЦР-продукт *Capra hircus* (коза) (356 bp); 4 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* (коза) (356 bp);
 5 – ПЦР-продукт *Ovis aries* (овца) (285/66 bp); 6 – ПДРФ-фрагмент *Ovis aries* (овца) (285/66 bp)

Оценка CSN3-ПЦР-ПДРФ-профиля показала, что в чистом виде применение всех трех видов энзимных рестриктаз дает положительный результат для оценки видовой специфичности изучаемых видов сельскохозяйственных животных.

Изученные методические подходы были применены для анализа смесей коровьего, козьего и овечьего молока в различных композициях. Полученные данные представлены на рисунках 4–6.

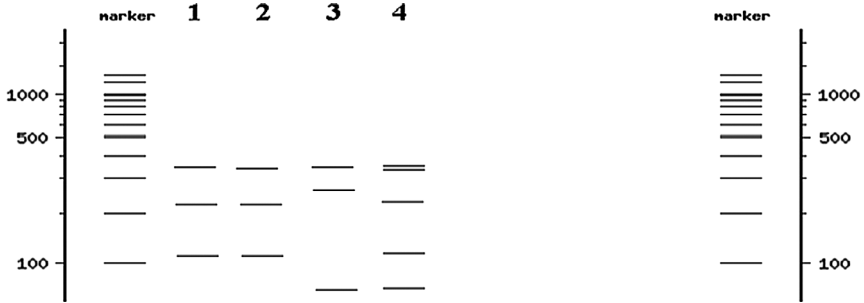


Рис. 4. CSN3-ПДРФ-профиль (комбинированный) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *Xba*I):
 1 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* (корова + коза) (223/127+356 bp);
 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Ovis aries* (корова + овца) (223/127+351 bp);
 3 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* + *Ovis aries* (коза + овца) (356 + 285/66 bp);
 4 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* + *Ovis aries* (223/127 + 356 + 285/66 bp)
 (корова + коза + овца)

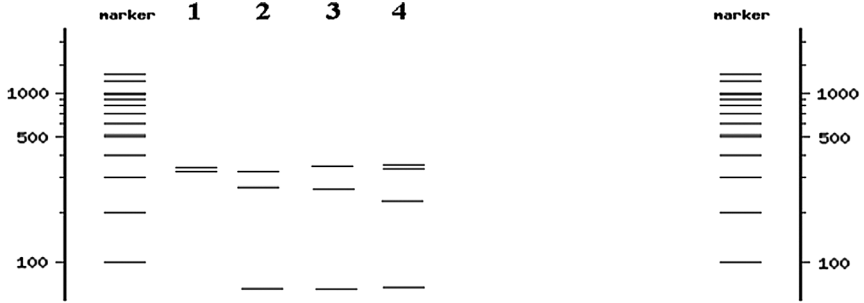


Рис. 5. CSN3-ПДРФ-профиль (комбинированный) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *Pst*I):
 1 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* (корова + коза) (350 + 356 bp);
 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Ovis aries* (корова + овца) (350 + 285/66 bp);
 3 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* + *Ovis aries* (коза + овца) (356 + 285/66 bp);
 4 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* + *Ovis aries* (корова + коза + овца)
 (350 + 356 + 285/66 bp)

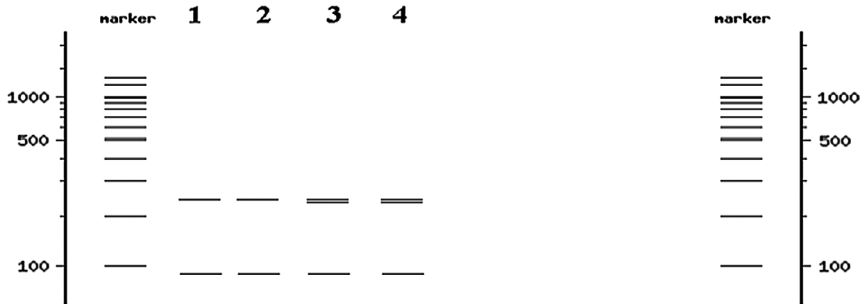


Рис. 6. CSN3-ПДРФ-профиль (комбинированный) (праймеры JK5 и JK3, рестриктаза *Rsa*I):
 1 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* (корова + коза) (262/88 + 262/87/7 bp);
 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Ovis aries* (корова + овца) (262/88 + 257/87/7 bp);
 3 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* + *Ovis aries* (коза + овца) (262/87/7 + 257/87/7 bp);
 4 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* + *Ovis aries* (корова + коза + овца)
 (262/88 + 262/87/7 + 257/87/7bp)

В результате исследовательской работы было отмечено, что наилучший результат для идентификации видовой принадлежности в смесях молока сельскохозяйственных животных получен при использовании рестриктаз *XbaI* и *PsiI*. Поэтому была проведена серия аналитических мероприятий с использованием комбинаторной системы, состоящей из двух рестриктаз.

По аналогии с предложенной методикой для начала были оценены видовые профили трех сельскохозяйственных животных (рис. 7).

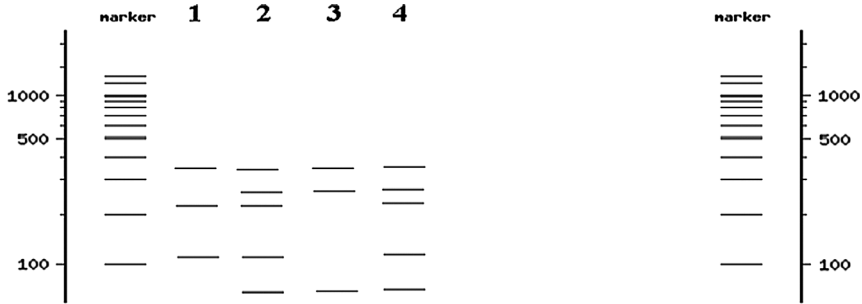


Рис. 7. CSN3-ПЦР-ПДРФ-профиль (видовой) (праймеры JK5 и JK3, рестриктазы *XbaI* + *PsiI*: 1 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* (корова + коза) (223/127 + 356 bp); 2 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Ovis aries* (корова + овца) (223/127+285/66 bp); 3 – ПДРФ-фрагмент *Capra hircus* + *Ovis aries* (коза + овца) (356+285/66 bp); 4 – ПДРФ-фрагмент *Bos taurus* + *Capra hircus* + *Ovis aries* (223/127 + 356 + 285/66 bp) (корова + коза + овца)

Полученные результаты показали, что применение комплекса из рестриктаз *XbaI* и *PsiI* дает лучший результат для оценки видоспецифичности изучаемых нуклеотидных последовательностей.

Выводы

Успешное применение ПЦР-анализа во многом зависит от методологических подходов к проведению аналитической процедуры, и в первую очередь это относится к качеству извлеченной ДНК. Экстракция высококачественной ДНК является решающим этапом в процессе идентификации молочного сырья. В результате исследовательской работы было отмечено, что наилучший результат для идентификации видовой принадлежности молока различных сельскохозяйственных животных получен при использовании рестриктаз *XbaI* и *PsiI*, а их комбинированное использование в ПЦР-анализе позволило выявить примеси молока на уровне 2%.

Библиографический список

1. Координационный Комитет ФАО/ВОЗ по Европе30/09/2019–04/10/2019 | Алматы, Казахстан. [Электронный ресурс]. Режим доступа: URL: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/detail/ru/?meeting=CCEURO&session=31>.
2. Юрова Е.А. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции / Е.А. Юрова, Н.А. Жижин, С.А. Фильчакова // Вестник МГТУ. – 2020. – Т. 23. – № 3. С. 214–223. DOI: 10.21443/1560–9278–2020–23–3–214–223.
3. Haza A.I. Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats / A.I. Haza, P. Molares, R. Martín, T. García [et al.]

// 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).

4. Ferreira I.M.P.L.V.O. 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 / I.M.P.L.V.O. Ferreira H. Caçote // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 1015, Iss. 1–2. – P. 111–118. DOI: 10.1016/s0021-9673(03)01261-5.

5. Gachet E. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available / E. Gachet, G G. Martin, F. Vigneau, G. Meer // 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).

6. Ахметов Т.М. Качество и технологические свойства сыра, изготовленного из молока коров, с разными генотипами каппа-казеина / Т.М. Ахметов, С.В. Тюлькин, О.Г. Зарипов, Э.Ф. Валиуллина [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2009. – № 1 (1). – С. 20–23.

7. Бигаева А.В. Сыропригодность молока коров с разными генотипами каппа-казеина / А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов, С.В. Тюлькин, Р.Р. Вафин [и др.] // Сыроделие и маслоделие. – 2019. – № 6. – С. 26–27. DOI: 10.31515/2073-4018-2019-6-26-27.

8. Бигаева А.В. Термостойчивость молока коров с разными генотипами каппа-казеина / А.В. Бигаева, Х.Х. Гильманов, С.В. Тюлькин, А.Г. Галстян [и др.] // Пищевая промышленность. – 2019. – № 10. – С. 59–61. DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10159.

9. Lockey A.K. DNA-based methods for food authentication / A.K. Lockey, R.G. Bardsley // 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).

10. Zimmermann K. Technical aspects of quantitative competitive PCR / K. Zimmermann, J.W. Mannhalter // BioTechniques. – 1996. – Vol. 21, Iss. 2. – P. 268–279. DOI: <https://doi.org/10.2144/96212rv01>.

11. Oganesyants L. DNA authentication of brewery products: Basic principles and methodological approaches / L. Oganesyants, R. Vafin, A. Galstyan, A. Ryabova [et al.] // Foods and Raw Materials. – 2019. – Vol. 7, Iss. 2. – P. 364–374. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-364-374>.

12. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др.; Под ред. д-ра биол. наук Д.В. Ребрикова; Предисл. Л.А. Остермана, акад. РАН и РАСХН Е.Д. Свердлова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 215 с.

USE OF PCR-ANALYSIS METHODS FOR EVALUATING COMPOSITION AND PROPERTIES OF MILK AND DAIRY PRODUCTS

E.A. YUROVA, S.A. FILCHAKOVA, N.A. ZHIZHIN

(All-Russian Dairy Research Institute)

The need to improve the quality and accuracy of measurements of the composition and properties of milk and dairy products leads to the wider use of modern analysis methods, including methods of molecular genetic research. The use of the PCR analysis method to identify the species composition of dairy products is the most promising. The paper considers the possibility of developing a measurement technique for assessing the composition

and properties of milk and dairy products using molecular genetic methods of analysis (PCR, PCR-RFLP, and sequencing). Evaluation of the sensitivity of the method and its metrological characteristics helped determine the most suitable research method.

Key words: milk, dairy products, molecular genetic research methods (PCR, PCR-RFLP, sequencing)

References

1. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/detail/ru/?meeting=C-CEURO&session=31>

2. *Yurova E.A.*, Primenenie molekulyarno-geneticheskikh metodov analiza dlya identifikatsii vidovoy prinadlezhnosti syr'yevogo sostava pishchevoy produktsii [Application of molecular genetic methods of analysis to identify the species of the raw material composition of food products] / E.A. Yurova, N.A. Zhizhin, S.A. Filchakova // Vestnik MGTU. 2020; 23; 3: 214–223. DOI: 10.21443/1560–9278–2020–23–3–214–223. (In Rus.)

3. *Haza A.I.* Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats / A.I. Haza, P. Molares, R. Martín, T. García [et al.]. // Journal of the Science of Food and Agriculture. 1999; 79; 7: 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).

4. *Ferreira I.M. P. L. V.O.* 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 / I. M. P. L. V.O. Ferreira, H. Caçote // Journal of Chromatography A. 2003;1015; 1–2: 111–118. DOI: 10.1016/s0021–9673(03)01261–5.

5. *Gachet E.* Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: A brief review of methodologies available / E. Gachet, G.G. Martin, F. Vigneau, G. Meer // Trends in Food Science & Technology. 1999; 9; 11–12: 380–388. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924–2244\(99\)00002–3](https://doi.org/10.1016/S0924–2244(99)00002–3).

6. *Akhmetov T.M.* Kachestvo i tekhnologicheskie svoystva syra, izgotovlennogo iz moloka korov s raznymi genotipami kappa-kazeina [Quality and technological properties of cheese made from cow milk with different genotypes of kappa-casein] / T.M. Akhmetov, S.V. Tyul'kin, O.G. Zaripov, E.F. Valiullina [et al.]. // Aktual'nyye voprosy veterinarnoy biologii. 2009; 1(1): 20–23. (In Rus.)

7. *Bigaeva A.V.* Syroprigodnost' moloka korov s raznymi genotipami kappa-kazeina [Cheese suitability of cow milk with different genotypes of kappa-casein] / A.V. Bigaeva Kh.Kh. Gil'manov, S.V. Tyul'kin A.G Galstyan. [et al.]. // Syrodellie i maslodellie. 2019; 6: 26–27. DOI: 10.31515/2073–4018–2019–6–26–27. (In Rus.)

8. *Bigaeva A.V.* Termoustoychivost' moloka korov s raznymi genotipami kappa-kazeina [Thermal stability of cow milk of with different genotypes of kappa-casein] / A.V. Bigaeva Kh.Kh. Gil'manov, S.V. Tyul'kin A.G Galstyan [et al.]. // Pishchevaya promyshlennost'. 2019; 10: 59–61. DOI: 10.24411/0235–2486–2019–10159. (In Rus.)

9. *Lockey A.K.* DNA-based methods for food authentication / A.K. Lockey, R.G. Bardsley // Trends in Food Science & Technology. 2000; 11; 2: 67–77. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924–2244\(00\)00049–2](https://doi.org/10.1016/S0924–2244(00)00049–2).

10. *Zimmermann K.* Technical aspects of quantitative competitive PCR / K. Zimmermann, J.W. Mannhalter // BioTechniques. 1996; 21; 2: 268–279. DOI: <https://doi.org/10.2144/96212rv01>.

11. *Oganesyants L.* DNA authentication of brewery products: Basic principles and methodological approaches / L. Oganesyants, R. Vafin, A. Galstyan, A. Ryabova [et al.]. // *Foods and Raw Materials*. 2019; 7; 2: 364–374. DOI: <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-364-374>.

12. PTSR “v real’nom vremeni” [PCR “in real time” conditions] / Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. and etc.; ed. by DSc (Bio) D.V. Rebrikov; foreword by L.A. Osterman and RAS and RAAS Full Member E.D. Sverdlov. – M.: BINOM. Laboratoriya znaniy. 2009:215. (In Rus.)

Юрова Елена Анатольевна, канд. техн. наук, зав. лабораторией, ФГАНУ Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7; 115093; e-mail: eyurova@vnimi.org; тел.: (499) 236-44-81).

Фильчакова Светлана Анатольевна, канд. техн. наук, доцент, науч. Сотрудник, ФГАНУ Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (115093, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7; e-mail: s_filchakova@vnimi.org).

Жижин Николай Анатольевич, канд. техн. наук, науч. сотрудник ФГАНУ Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности (115093, г. Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7; e-mail: n_zhizhin@vnimi.org).

Elena A. Yurova, PhD (Eng); All-Russian Dairy Research Institute, (35, Lyusinovskaya Str., block 7, Moscow, Russia, 115093; phone: (499) 236-44-81, e-mail: e_yurova@vnimi.org).

Svetlana A. Filchakova, PhD (Eng); All-Russian Dairy Research Institute, (35, Lyusinovskaya Str., block 7, Moscow, Russia, 115093; e-mail: s_filchakova@vnimi.org).

Nikolay A. Zhizhin, PhD (Eng), Research Associate; All-Russian Dairy Research Institute, (35, Lyusinovskaya Str., block 7, Moscow, Russia, 115093; e-mail: n_zhizhin@vnimi.org).