УДК 637.07:613.287.6 https://doi.org/10.21603/1019-8946-2024-5-8

ПОИСК ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КОЗЬЕГО МОЛОКА И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Алексей Владимирович Хан, младший научный сотрудник
Дарья Дмитриевна Коваль, младший научный сотрудник
Екатерина Германовна Лазарева, младший научный сотрудник
Олег Юрьевич Фоменко, канд. биол. наук, старший научный сотрудник
Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, г. Москва

Растущий интерес потребителей к продуктам на основе козьего молока и повышение объемов их производства сопровождается увеличением рисков фальсификации – замены козьего молока коровьим. Поэтому важным аспектом является создание точных методов для выявления подлинности молока мелких жвачных животных. Для проведения анализа по установлению видовой принадлежности данной продукции необходимо выделить ДНК из соматических клеток молока. В качестве объектов исследования выбраны образцы сырого, стерилизованного, пастеризованного и сухого козьего молока. Для выбора оптимального набора для экстракции ДНК мы проанализировали широко распространенные в России коммерческие наборы. Эти наборы основаны на различных методах экстракции ДНК: «ДНК-Сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) использует метод с применением кремниевых частиц; «ДНК-Экстран-2» (ООО «НПФ Синтол», Россия) основан на высаливании нуклеиновых кислот; «ГМО-Сорб-Б» (ООО «НПФ Синтол», Россия) использует органическую экстракцию; «ГМО-Магносорб» (ООО «НПФ Синтол», Россия) – магнитные частицы. Для оценки образцов выделенной ДНК применялась качественная симплексная ПЦР с последующей постановкой гель-электрофореза. В качестве гена-мишени выбран фрагмент D-петли митохондриальной ДНК *Capra hircus*. Полученные данные демонстрируют преимущества сорбентных методов выделения нуклеиновых кислот в контексте молекулярно-генетического определения происхождения продукции из козьего молока. Таким образом, использование сорбентных методов может значительно упростить и ускорить процесс молекулярно-генетического определения происхождения молочной продукции, что имеет важное значение для обеспечения качества и безопасности молочных продуктов на рынке. В целом, данное исследование вносит значительный вклад в развитие методов мониторинга молока мелкого рогатого скота, что способствует повышению доверия потребителей к продукции этого сектора.

Ключевые слова: мелкий рогатый скот, козье молоко, ДНК, ПЦР, экстракция, фальсификация

Для цитирования: Поиск оптимальных методов выделения ДНК из козьего молока и продуктов его переработки / А. В. Хан, Д. Д. Коваль, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. 2024. № 5. С 42–47. https://doi.org/10.21603/1019-8946-2024-5-8

ВВЕДЕНИЕ

Козье молоко и продукты его переработки, такие как сыр, творог, йогурт и другие, являются ценными источниками питательных веществ. Важным преимуществом данных продуктов является гипоаллергенность, легкоусвояемость, высокая питательная ценность [1]. В последнее время в детских молочных смесях сухое козье молоко становится все более популярным заменителем сухого коровьего молока. Это вызвано большим сходством белкового профиля козьего молока с белковым составом грудного молока, что способствует его более эффективному усвоению и быстрому формированию микробиома желудочно-кишечного тракта у младенцев [2–4]. Помимо этого, усвоение жира из козьего молока происходит более эффективно по сравнению с коровьим благодаря высокому содержанию коротко- и среднецепочечных жирных кислот, которые всасываются непосредственно в венозную сеть [2, 5]. На основе козьего молока активно создаются продукты функциональной направленности. Например, смеси для геродиетического и лечебно-профилактического питания часто включают козье молоко в качестве основного компонента из-за высокого содержания белка и сбалансированности аминокислотного состава [6–8]. По мнению Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, козье молоко может использоваться как инструмент для достижения целей устойчивого развития, включая борьбу с голодом, обеспечение продовольственной безопасности, улучшение питания и обеспечение благополучия для всех возрастных групп [1].

По данным Streda Consulting [9], в России производство козьего молока составляет около 256 тысяч тонн в год и с каждым годом это количество постепенно увеличивается, оставаясь, однако, значительно ниже уровня производства коровьего молока. По данным Минсельхоза, в 2024 году в рамках компенсирующей и стимулирующей субсидии на поддержание производства молока было направлено 14,3 млрд рублей. Растущий интерес населения к козьим молочным продуктам, государственная поддержка предприятий молочной промышленности и очевидная экономическая выгода побуждает недобросовестных производителей к фальсификации козьего молока путем частичной подмены коровьим. Создание эффективных методов обнаружения фальсификации является важной и необходимой задачей в современном мире.

Все больше исследователей сходятся во мнении о том, что наиболее эффективным способом определения видовой принадлежности молока и молочной продукции является применение молекулярно-генетических методов [10]. Большинство из них требуют экстракции ДНК, и многие авторы уже подтвердили, что молоко является хорошим источником геномной ДНК за счет содержащихся в нем соматических клеток [11–15]. Широко распространенными методами выделения и очистки ДНК из соматических клеток являются методы на основе высаливания, использования кремнеземных и магнитных частиц и органической экстракции [11]. Выбор методики экстракции и очистки ДНК может быть критическим поскольку концентрация, чистота и целостность выделенной ДНК напрямую влияют на возможность определения видового происхождения молочной продукции. Высаливание нуклеиновых кислот (НК) подразумевает использование раствора с высокой концентрацией солей для осаждения белковых молекул в клеточном лизате с последующим центрифугированием и отделением белкового осадка от надосадочной жидкости, содержащей ДНК. Методика использования кремнеземных частиц позволяет связать НК в растворе с высокой концентрацией солей и удалить другие продукты лизиса клеток, а затем элюировать НК с поверхности сорбента, используя раствор с низкой концентрацией солей. Применение магнитных частиц с кремниевым покрытием аналогично использованию кремнеземного сорбента. Особенность метода – применение магнитного штатива, который позволяет осажденным на поверхности магнитных шариков НК оставаться на дне пробирки. Органическая экстракция заключается в добавлении к клеточному лизату изоамилового спирта для осаждения ДНК, фенола для разрушения белков и хлороформа для разделения водной и органической фазы.

Целью работы являлся выбор оптимального коммерчески доступного метода экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки для последующей постановки ПЦР-реакций и учета результатов с применением гель-электрофореза.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проводилась в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» (Москва, Россия).

В рамках данной работы было использовано сухое цельное молоко «Твоя ферма» (ООО «СБТ-АГРО», Россия), сырое козье молоко, купленное в КФХ «Козья ферма САТИ» (деревня Лукино, Московская область, Россия), а также продукты его переработки: молоко пастеризованное козье (Т = 90 ± 2 °С с выдержкой 5 мин), молоко стерилизованное козье (Т = 121 ± 2 °С с выдержкой 3 мин), молоко сухое козье.

Пробоподготовка объектов исследования включала отбор 1 мл жидких проб с последующим центрифугированием на высокоскоростной мини-центрифуге Microspin 12 (Biosan, Latvia) при 12,4 тыс. об/мин, удалением супернатанта с сохранением полученного клеточного осадка для последующего выделения и очистки нуклеиновых кислот. В свою очередь, пробоподготовка сухого козьего молока включала взвешивание навесок массой 100 мг для дальнейших манипуляций.

Экстракция ДНК была проведена с использованием коммерческих наборов на основе адсорбционных методов – «ДНК-Сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «ГМО-Сорб-Б» (ООО «НПФ Синтол», Россия), «ГМО-Магносорб» (ООО «НПФ Синтол», Россия) и жидкофазном методе с солевым осаждением – «ДНК-Экстран-2» (ООО «НПФ Синтол», Россия) в соответствии с рекомендациями производителей (табл. 1).

Оценку уровня фрагментации препаратов ДНК, выделенных из объектов исследования, проводили путем электрофореза в 1 % агарозном геле (VWR International LLC, США), предварительно окрашенном раствором бромистого этидия. Электрофорез с целью качественной оценки суммарной ДНК про-

Таблица 1
Методы экстракции ДНК

Наименование набора в работе	Название набора	Сущность метода
Набор № 1	«ДНК-Сорб-С-М»	Лизирующий буфер + адсорбционные свойства сорбента
Набор № 2	«ДНК-Экстран-2»	Лизирующий буфер + солевой буфер
Набор № 3	«ГМО-Сорб-Б»	Лизирующий буфер + адсорбционные свойства сорбента + детергент (ЦТАБ) + хлороформ
Набор № 4	«ГМО-Магносорб»	Лизирующий буфер + адсорбционные свойства магнитных частиц

Источник изображения: unsplash.com

водили при напряжении электрического поля 7 В/см геля в течение 1 часа с применением маркера длин ДНК «100+ bp DNA Ladder» (ЗАО «Евроген», Россия). Документирование осуществляли с использованием системы гель-документирования «Vilber E-Box-CX5.TS» (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе «Vilber Super-Bright» (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

ПЦР-анализ проводили с использованием пары олигонуклеотидных праймеров (ЗАО «Евроген», Россия), комплиментарных фрагменту митохондриальной ДНК (мтДНК) домашней козы (*Capra hircus*) (табл. 2) [10]. В ходе сравнительного анализа ингибирования ПЦР были проведены 2 серии амплификации ДНК, полученной из четырех козьих молочных продуктов с помощью выделения коммерческими наборами. Объем вносимой пробы препаратов ДНК составлял 4 % и 20 % от конечного объема ПЦР-смеси.

Первая серия амплификации проводилась с использованием ПЦР-смеси, в состав которой входили: 1 мкл выделенной геномной ДНК, 5 мкл смеси Screen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл прямого (CHF) и 1 мкл обратного праймера (CHR), 17 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия). Состав ПЦР-смеси для проведения второй серии амплификации включал в себя 5 мкл выделенной геномной ДНК, 5 мкл смеси Screen Mix (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл прямого (CHF) и 1 мкл обратного праймера (CHR), 13 мкл деионизованной воды (ЗАО «Евроген», Россия). Программа амплификации включала следующие этапы: 1 цикл начальной денатурации при 95 °C 5 минут, 35 циклов (денатурация 95 °C 15 секунд, отжиг праймеров 57 °C 15 секунд, элонгация 72 °C 30 секунд), 1 цикл финальной элонгации при 72 °C в течение 10 минут на амплификаторе MiniAmp («ThermoFisher Scientific», США). Теоретически ожидаемая длина амплифицированного фрагмента составляет 184 пары оснований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным результатам электрофоретических исследований, значительное количество ДНК из сырого и сухого козьего молока остается высокомолекулярной, несмотря на наличие полос из фрагментированных нуклеиновых кислот (рис. 1). Анализ уровня фрагментирования суммарной ДНК из пастеризованного и стерилизованного молока затруднен, предположительно вследствие незначительного числа молекул ДНК.

Рисунок 1. Электрофореграмма типовых результатов выделения суммарной ДНК из сырого, пастеризованного, стерилизованного и сухого козьего молока наборами № 1–4. M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Таблица 2
Последовательности праймеров для детекции *Capra hircus*

Название	Последовательность	Длина праймера, п. о.	Мишень
CHF	ACTCCACAAGCTTACAGACATGCCA	25	фрагмент Д-петли
CHR	GAAGGCTGTATGTCCGCGTTATATG	25	

На рисунке 2 представлен результат амплификации ДНК из сырого козьего молока. Данные на электрофореграмме демонстрируют, что внесение ДНК, полученной методом высаливания, в количестве 20 % от общего объема реакционной смеси приводит к полному ингибированию качественной ПЦР. В отличие от метода № 2, сорбционные методы (№ 1, 3 и 4) не приводят к появлению ложноотрицательных результатов. Тем не менее, использование малых объемов вносимой пробы (4 % от общего объема реакционной смеси) не оказывает ингибирующего эффекта на процесс амплификации независимо от метода выделения ДНК.

Что касается пастеризованного молока, то обнаружение на электрофореграмме исключительно ампликонов целевой длины происходило во всех пробах, амплифицированных с использованием малого объема раствора ДНК. Напротив, внесение 20 % раствора ДНК, экстрагируемой набором № 2, от общего объема реакционной смеси, препятствует синтезу ампликонов (рис. 3).

Аналогичные результаты наблюдаются в случае использования незначительного объема ДНК, полученной при использовании всех методов экстракции, из сухого козьего молока, поскольку отмечается накопление амплифицированных фрагментов. Тем не менее, использование 20 % объема раствора ДНК, выделенной методом на основе солевого осаждения также ограничивает эффективность синтеза дочерних цепей ДНК (рис. 4).

Следует отметить, что в случае исследования проб ДНК, выделенных из стерилизованного козьего молока, амплификация целевого фрагмента мтДНК *Capra hircus* наблюдалась в 100 % случаев (рис. 5).

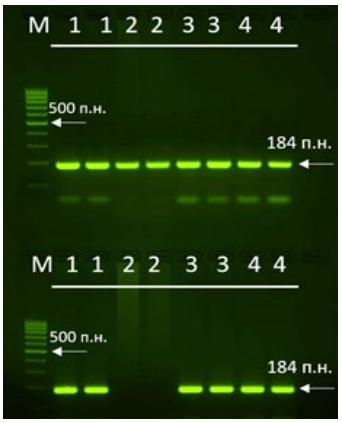

Рисунок 2. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами CHF и CHR и ДНК, выделенной наборами № 1–4 из сырого козьего молока; добавление 4 % объема раствора ДНК (верхний ряд) и 20% объема (нижний ряд); M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

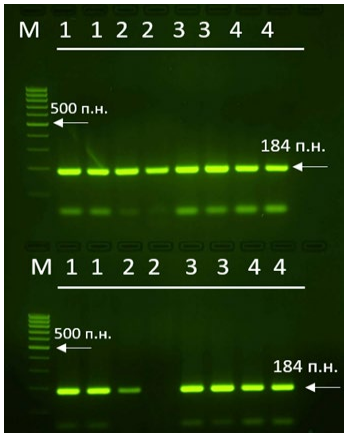

Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами CHF и CHR и ДНК, выделенной наборами № 1–4 из пастеризованного козьего молока; добавление 4 % объема раствора ДНК (верхний ряд) и 20 % объема (нижний ряд); M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

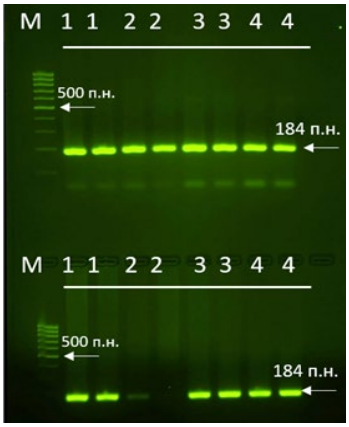

Рисунок 4. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами CHF и CHR и ДНК, выделенной наборами № 1–4 из сухого козьего молока; добавление 4 % объема раствора ДНК (верхний ряд) и 20 % объема (нижний ряд); M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

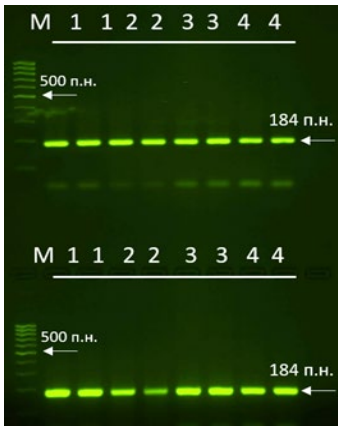

Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами CHF и CHR и ДНК, выделенной наборами № 1–4 из стерилизованного козьего молока; добавление 4 % объема раствора ДНК (верхний ряд) и 20 % объема (нижний ряд); M – маркер («100 + bp DNA Ladder»)

Источник изображения: unsplash.com

Анализ эффективности методов экстракции ДНК показал, что сорбентные методы являются более предпочтительными, поскольку они позволяют получить образцы ДНК более высокого качества. Это не всегда достижимо при использовании метода на основе высаливания. Использование 20 % растворов образцов ДНК при постановке ПЦР, выделенных с помощью метода солевого осаждения, показало ингибирование реакций, что видно по результатам постановки гель-электрофореза (рис. 1–4). Однако ингибирование ПЦР не наблюдается в случае постановки ПЦР с 4 % растворами ДНК. Можно предположить, что полученный результат объясняется тем, что использование раствора с более высокой концентрацией ДНК приводит к попаданию в образец большего количества ингибирующих веществ. Эти вещества могли присутствовать в образце изначально, например, в виде ионов кальция, а также могли быть добавлены в образец ДНК на этапе выделения, например, в виде хлорида натрия (NaCl).

Ранее в исследованиях, связанных с экстракцией ДНК из различных типов биоматериалов, включая молочные продукты, было показано, что выбор метода экстракции оказывает значительное влияние на результат. Например, метод высаливания оказался более экономически выгодным и экологически безопасным, но сорбционные методы, использующие кремнезем или магнитные частицы, продемонстрировали лучшую эффективность при работе с более сложными матрицами [16, 17]. Кроме того, методы на основе высаливания требуют длительной инкубации для лизиса клеточных структур и, вероятно, не позволяют полностью устранить ингибирующие вещества, что может снизить качество выделенной ДНК [18]. Для молочнокислых бактерий адсорбция на магнитных частицах показала воспроизводимость, сопоставимую с фенольной экстракцией, что подтверждает важность оптимального выбора метода в зависимости от типа образца и целей исследования[1].

Данные согласуются с нашими результатами, указывающими на то, что сорбционные методы имеют преимущество при анализе молока, особенно после термической обработки. Это особенно актуально в контексте видовой идентификации молока для предотвращения фальсификации. Наше исследование подчеркивает необходимость выбора оптимального коммерчески доступного метода экстракции ДНК в зависимости от специфики образца и целей исследования, что может значительно улучшить точность и надежность молекулярно-генетических методов анализа.

ВЫВОДЫ

Исходя из вышеописанных результатов молекулярно-генетического анализа становится очевидно, что при работе с молочными матрицами сорбционные методы экстракции обладают рядом преимуществ по сравнению с методом высаливания, и позволяют получать высокомолекулярные препараты нуклеиновых кислот. Применение методов экстракции на основе сорбентов позволяет исключить появление ложноотрицательных результатов, что играет ключевую роль при определении происхождения продукции из козьего молока. ■

[1]Španová, A. Comparison of PCR-ready DNA Isolation Methods from Lactic Acid Bacteria used in Dairy Industry / A. Španová [et al.]. – 7th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. – Vancouver: University of British Columbia, Canada, 2008. – P. 203.

OPTIMAL METHODS FOR DNA EXTRACTION FROM GOAT MILK AND DERIVATIVES

Alexey V. Khan, Darya D. Koval, Ekaterina G. Lazareva, Oleg Yu. Fomenko
All-Russian Dairy Research Institute, Moscow

ORIGINAL ARTICLE

Goat dairy products keep growing in popularity and production volumes. However, the risks of counterfeiting also increase as more and more goat milk is substituted with cow milk. Inspecting authorities need reliable methods to check the authenticity of milk obtained from small ruminants. The type of ruminant can be determined by isolating DNA from somatic cells in the milk. This research featured samples of raw, sterilized, pasteurized, and powdered goat milk. The research objective was to select the optimal kit for DNA extraction from a number of commercial kits available in Russia. The DNK-Sorb-S-M was developed at the Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Russia, and employs silicon particles. The Sintol Research and Production Company, Russia, designed three DNA kits. The DNK-Extran-2 relies on salting out nucleic acids; the GMO-Sorb-B uses the organic extraction method; the GMO-Magnosorb is based on magnetic particles. This research involved a high-quality simplex PCR followed by gel electrophoresis to define the isolated DNA samples. A fragment of the D-loop of mitochondrial DNA of *Capra hircus* served as the target gene. The sorbent methods for nucleic acid extraction proved more efficient as they were able to simplify and accelerate molecular genetic tests, thus ensuring the quality and safety of commercial dairy products. New control methods increase consumer confidence in goat dairy products.

Keywords: small heminant, goat milk, DNA, PCR, extraction, isolation

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Idamokoro, E. M.** The significance of goat milk in enhancing nutrition security: a scientiometric evaluation of research studies from 1966 to 2020 / E. M. Idamokoro // Agriculture & Food Security. 2023. Vol. 12. №. 1. P. 34. https://doi.org/10.1186/s40066-023-00441-5
2. **Захарова, И. Н.** Смеси на основе козьего молока в питании детей раннего возраста: что мы знаем о них сегодня? / И. Н. Захарова, Т. Э. Боровик, А. Н. Касьянова [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. Т. 63, № 6. С. 31–36. https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-5-31-36; https://www.elibrary.ru/yqzjmd
3. **Maathuis, A.** Protein Digestion and Quality of Goat and Cow Milk Infant Formula and Human Milk Under Simulated Infant Conditions / A. Maathuis // Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2017. Vol. 65(6). P. 661–666. https://doi.org/10.1097/ MPG.0000000000001740
4. **Wang, Z.** Evaluation of the nutrition and function of cow and goat milk based on intestinal microbiota by metagenomic analysis / Z. Wang [et al.] // Food & Function. 2018. Vol. 9, Iss. 4. P. 2320–2327. https://doi.org/10.1039/c7fo01780d
5. **Haenlein, G. F. W.** Goat milk in human nutrition / G. F. W. Haenlein // Small Ruminant Research. 2004. Vol. 51(2). P. 155–163. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010
6. **Мельденберг, Д. Н.** Разработка комплексной оценки белкового состава молока сырья различных сельскохозяйственных животных для выработки продуктов функциональной направленности / Д. Н. Мельденберг, О. С. Полякова, Е. С. Семенова, Е. А. Юрова // Хранение и переработка сельхозсырья. 2020. № 3. С. 118–133. https://doi.org/10.36107/spfp.2020.352; https://elibrary.ru/ifwhek
7. **Юрова, Е. А.** Изучение состава и свойств молока сельскохозяйственных животных как основы для производства продуктов функциональной направленности / Е. А. Юрова, С. А. Фильчакова, О. С. Полякова, Н. А. Жижин // Молочная промышленность. 2020. № 12. С. 7–9. https://doi.org/10.31515/1019-8946-2020-12-7-9; https://elibrary.ru/sscbfb
8. **Verruck, S.** Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health / S. Verruck [et al.] // Journal of Functional Foods. 2019. Vol. 52. P. 243–257. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017
9. **Куликова, Н. И.** Современное состояние и перспективы развития отрасли козоводства / Н. И. Куликова, А. С. Козубов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2022. № 183. С. 130–138. https://doi.org/10.21515/1990-4665-183-012; https://elibrary.ru/bbhahg
10. **Гильманов Х. Х.** Проблема фальсификации видовой принадлежности молока / Х. Х. Гильманов, Р. Р. Вафин, В. Г. Блиадзе, И. Ю. Михайлова // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. 2020. Т. 1, № 1(1). С. 125–129. https://doi.org/10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-125-129; https://elibrary.ru/rvzgvt
11. **Pokorska, J.** New Rapid Method of DNA Isolation from Milk Somatic Cells / J. Pokorska // Animal Biotechnology. 2016. Vol. 27, № 2. P. 113–117. https://doi.org/10.1080%2F10495398.2015.1116446
12. **Amills, M.** Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin / M. Amills [et al.] // The Journal of dairy research . 1997. Vol. 64, № 2. P. 231–238. https://doi.org/10.1017/s0022029997002161
13. **D'Angelo, F.** Technical note: a simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: investigation into the goat CSN1S1 gene / F. D'Angelo [et al.] // Journal of dairy science. 2007. Vol 90(7). P. 3550–3552. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0149
14. **Usman, T.** Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk / T. Usman [et al.] // Genetics and Molecular Research. 2014. Vol. 13, № 2. P. 3319–3328. https://doi.org/10.4238/2014.april.29.10
15. **Deng, L.** Detection of the Bovine Milk Adulterated in Camel, Horse, and Goat Milk Using Duplex PCR / L. Deng, [et al.] // Food Analytical Methods. 2020. Vol. 13(4). P. 560–567. https://doi.org/10.1007/s12161-019-01678-2
16. **Benitez-Velásquez, M.** Assessment of four different DNA extraction methodologies for the molecular detection of phage λ and *Bacillus* sp. in raw bovine milk samples / M. Benitez-Velásquez [et al.] // International Dairy Journal. 2024. Vol. 151. 105862. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105862
17. **Yalçınkaya, B.** Comparison of DNA extraction methods for meat analysis / B. Yalçınkaya [et al]. // Food Chemistry. 2017. Vol. 221. P. 1253–1257. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.032
18. **Schrader, C.** PCR inhibitors–occurrence, properties and removal / C. Schrader [et al.] // Journal of applied microbiology. 2012. Vol. 113. №. 5. P. 1014–1026. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x