

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2579>
<https://elibrary.ru/DZCAXM>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Сравнительный анализ методов выделения бактериальной ДНК из козьего молока и продуктов на его основе



Д. Д. Коваль*^{ID}, А. В. Хан^{ID}, Е. Г. Лазарева^{ID}, О. Ю. Фоменко^{ID}

Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности^{ROR}, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 27.02.2025
Принята после рецензирования: 25.03.2025
Принята к публикации: 01.04.2025

*Д. Д. Коваль: d_koval@vniimi.org,
<https://orcid.org/0009-0004-1491-7423>
А. В. Хан: <https://orcid.org/0009-0007-6106-6088>
Е. Г. Лазарева: <https://orcid.org/0000-0002-8069-9661>
О. Ю. Фоменко: <https://orcid.org/0000-0001-7852-3790>

© Д. Д. Коваль, А. В. Хан, Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко, 2025



Аннотация.

Несмотря на востребованность в молекулярной диагностике, выделение бактериальной ДНК из молочных продуктов остается малоизученной областью. Актуальность работы обусловлена необходимостью оценки эффективности методов экстракции ДНК для обнаружения микроорганизмов в пищевых матрицах. Цель исследования – провести сравнительный анализ методов экстракции бактериальной ДНК из козьего молока и продуктов его переработки.

Объекты исследования – сырое, пастеризованное и сухое козье молоко, а также кисломолочный продукт на йогуртовой закваске (йогурт) и сыр на основе козьего молока. Нуклеиновые кислоты из молока и молочных продуктов выделяли с использованием 5 коммерчески доступных наборов, основанных на применении кремнеземного сорбента (ДНК-Сорб-С-М), солевого осаждения нуклеиновых кислот (ДНК-Экстран-2), спин-колонок с кремниевым фильтром (К-Сорб), магнитных частиц (ГМО-МагноСорб), комбинации фенол-хлороформной экстракции и кремниевого сорбента (Сорб-ГМО-Б). Анализ концентрации и чистоты препаратов ДНК проводили флуори- и спектрометрическими методами. Выделенная суммарная ДНК использовалась в качестве матрицы для амплификации фрагментов бактериальных генов 16S рРНК.

Все наборы эффективно выделяли бактериальную ДНК из молочных продуктов, за исключением образцов сухого молока. Возможно, отсутствие амплификации в данных образцах было связано с технологическими особенностями производства или деградацией ДНК во время экстракции. Лучшие результаты показал метод с фенол-хлороформной экстракцией и кремниевым сорбентом, особенно для сложных матриц. Метод с кремнеземным сорбентом без органических растворителей занял второе место по эффективности. Анализ выхода и чистоты бактериальной ДНК, полученной различными методами экстракции, показал, что не все из них оказывались эффективными при работе с молочными матрицами.

Проведенные исследования позволили заключить, что наиболее продуктивным и универсальным методом экстракции ДНК из козьего молока и продуктов его переработки оказался метод фенол-хлороформной экстракции с адсорбцией на кремниевом сорбенте. Эффективность использования любого протокола может быть улучшена путем его адаптации к особенностям анализируемого продукта с учетом его вязкости, плотности, содержания бактериальных клеток, наличия или отсутствия сложных белковых, экзополисахаридных или жировых матриц, в которых заключены микроорганизмы и т. д.

Ключевые слова. Молекулярно-генетические методы, ПЦР, методы выделения ДНК, нуклеиновая кислота, молочные продукты, козье молоко

Финансирование. Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания по направлению FNSS-2025-0002 «Развить методологические основы мониторинга молочной продукции с элементами кластеризационной идентификации, формирующей гибкую аналитическую систему оценки в условиях глобальной прослеживаемости» на базе ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности^{ROR}».

Для цитирования: Коваль Д. Д., Хан А. В., Лазарева Е. Г., Фоменко О. Ю. Сравнительный анализ методов выделения бактериальной ДНК из козьего молока и продуктов на его основе. Техника и технология пищевых производств. 2025. Т. 55. № 2. С. 390–399. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2579>

Isolating Bacterial DNA from Goat Milk and Its Products: Comparative Analysis

Daria D. Koval*^{ID}, Aleksej V. Khan^{ID},
Ekaterina G. Lazareva^{ID}, Oleg Yu. Fomenko^{ID}

All-Russian Dairy Research Institute^{ROR}, Moscow, Russia

Received: 27.02.2025
Revised: 25.03.2025
Accepted: 01.04.2025

*Daria D. Koval: d_koval@vnimi.org,
<https://orcid.org/0009-0004-1491-7423>
Aleksej V. Khan: <https://orcid.org/0009-0007-6106-6088>
Ekaterina G. Lazareva: <https://orcid.org/0000-0002-8069-9661>
Oleg Yu. Fomenko: <https://orcid.org/0000-0001-7852-3790>

© D.D. Koval, A.V. Khan, E.G. Lazareva, O.Yu. Fomenko, 2025



Abstract.

Despite its high demand in molecular diagnostics, the bacterial DNA extraction from dairy products remains an understudied area. The effectiveness of different DNA extraction methods for detecting microorganisms in food matrices needs a comprehensive comparative analysis. The article introduces a comparative analysis of bacterial DNA extraction methods from goat milk and its products.

The research included samples of raw, pasteurized, and powdered goat milk, as well as a goat milk yogurt and a goat milk cheese. The nucleic acid tests relied on five commercially available kits based on 1) a silica sorbent (DNA-Sorb-S-M), 2) salt precipitation of nucleic acids (DNA-Extran-2), 3) spin columns with a silica filter (K-Sorb), 4) magnetic particles (GMO-MagnoSorb), 5) a combination of phenol-chloroform extraction and silica sorbent (Sorb-GMO-B). The concentration and purity of DNA preparations were analyzed using standard fluo- and spectrometric methods. The isolated total DNA was used as a template for amplification of bacterial 16S rRNA gene fragments.

All kits were able to isolate bacterial DNA from all samples but goat milk powder, where the lack of amplification could be due to some technological production features or DNA degradation during extraction. The best results belonged to the method that combined phenol-chloroform extraction and silicon sorbent, especially for complex matrices. The method with silica sorbent without organic solvents was second in efficiency. The analysis of the yield and purity of bacterial DNA showed that some methods were less effective with milk matrices.

The method of phenol-chloroform extraction with adsorption on a silicon sorbent proved to be the most productive and universal method for extracting DNA from goat milk and its products. However, other protocols could be calibrated for specific viscosity, density, bacterial cell count, complex protein profile, exopolysaccharide/fat matrices of microbial encapsulation, etc.

Keywords. Molecular genetic methods, PCR, DNA extraction methods, nucleic acid, dairy products, goat milk

Funding. The research was carried out using subsidies for the implementation of the State Assignment FNSS-2025-0002 “Development of methodological foundations of dairy product monitoring with elements of clustering identification, forming a flexible analytical evaluation system under conditions of global traceability” on the basis of All-Russian Dairy Research Institute^{ROR}.

For citation: Koval DD, Khan AV, Lazareva EG, Fomenko OYu. Isolating Bacterial DNA from Goat Milk and Its Products: Comparative Analysis. Food Processing: Techniques and Technology. 2025;55(2):390–399. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2025-2-2579>

Введение

В настоящее время мировое сообщество обеспокоено достижением целей устойчивого развития (ЦУР). Согласно отчету Организации объединенных наций (ООН) от 2 мая 2024 г., особенно тревожная ситуация складывается в борьбе с голодом и обеспечением продовольственной безопасности (ЦУР 2) [1]. Проблема неполноценного питания проявляется как в дефиците питательных веществ, что влечет за собой повышение рисков инфекционных заболеваний, так

и в избыточном весе, что увеличивает риск развития заболеваний неинфекционной природы [2]. Молоко и молочные продукты являются одними из ключевых инструментов решения этих глобальных проблем, т. к. они обладают уникальным составом необходимых питательных веществ. Это подтвердили совместные исследования некоммерческой отраслевой ассоциации Global Dairy Platform (GDP), Food and Agriculture Organization (FAO) и International Farm Comparison Network (IFCN), которые показали влияние потреб-

ления молочных продуктов на улучшение здоровья населения, сокращение бедности и голода [3]. Однако молоко может играть такую важную роль только при условии строгого контроля его физико-химического и микробиологического состава для подтверждения отсутствия посторонних загрязнений и патогенных микроорганизмов.

Согласно ГОСТ 32901-2014, для проверки продукции на наличие патогенных микроорганизмов используются стандартные методы микробиологической диагностики. Они включают приготовление питательных сред, посев и культивирование образцов, окраску бактериальных культур метиленовым синим и по Граму, микроскопирование и другие процедуры. Большинство этих методов были разработаны в конце XIX – начале XX в. и имеют существенные недостатки: длительное время культивирования (24–72 ч), ошибки в следствие неправильного подбора питательных сред, а также сложности с идентификацией бактериальных колоний по их фенотипическим признакам (например, металлический блеск, аморфная или зернистая структура, ровные или волнистые края и другие особенности). Поэтому все большее влияние для контроля качества и безопасности в секторе молочной промышленности приобретают методы молекулярно-генетической диагностики, такие как секвенирование (метагеномное, полногеномное, баркодирование ДНК), тест-системы на основе ПЦР (симплексные и мультиплексные), РВ-ПЦР, прямая ПЦР и др. [4–7]. Данные методики требуют предварительной подготовки, а именно этапа экстракции нуклеиновых кислот.

Большинство исследований, посвященных выделению ДНК из молока, сосредоточены на коровьем молоке и продуктах его переработки [8–13]. Однако другие виды молока также заслуживают внимание исследователей. Например, козье молоко, которое занимает второе место в мире по производству и потреблению после коровьего молока. По данным компании маркетинговых исследований Research and Markets, к концу 2028 г. объем рынка продуктов из козьего молока достигнет 18,9 млрд долларов [14]. Козье молоко широко применяется в производстве детского и геронтологического питания, а также в косметологии [15]. Благодаря своим уникальным характеристикам оно пользуется популярностью у людей с непереносимостью коровьего молока.

Выбор оптимального метода выделения нуклеиновых кислот является важной задачей для молочной промышленности и контролирующих органов государственной санитарно-эпидемиологической службы, т. к. будущее молочной отрасли невозможно без интеграции методов молекулярно-генетической диагностики в повседневную практику.

Одной из наиболее популярных технологий, которая широко применяется по всему миру в готовых наборах для выделения ДНК, является применение спин-колонок с кремнеземной мембраной. Примерами таких набо-

ров являются Milk DNA Preservation and Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Canada), FavorPrep Milk Bacterial DNA Extraction Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan), HigherPurity Milk Bacterial DNA Extraction Kit (Canvax, Spain), Milk Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (BioCat GmbH, Germany). Еще один распространенный метод экстракции – использование способности ДНК связываться с поверхностью парамагнитных шариков. Эта технология реализована в наборах First-Magnetic Milk Kit (Gen-IAL, Germany), XpressDNA Milk Kit (MagGenome Technologies Pvt. Ltd., India), SphaeraMag Genomic DNA Milk Purification Kit (Procomcure Biotech, Austria). К другим методам выделения нуклеиновых кислот из молока относят высаливание, фенол-хлороформный метод и ионообменный метод очистки с помощью смол Chelex 100, AG MP-1M (Bio-Rad, USA) и др. [13, 14]. Однако на данный момент специализированные коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот из молока на основе вышеперечисленных методов не представлены на российском рынке.

Высаливание нуклеиновых кислот 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 с кремнеземными частицами позволила связать нуклеиновые кислоты в растворе с высокой концентрацией солей и удалить другие продукты лизиса клеток, а затем элюировать нуклеиновые кислоты 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 ДНК, осажденной на поверхности магнитных шариков, 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 фаз.

Цель исследования – сравнительный анализ методов экстракции бактериальной ДНК из козьего молока и продуктов его переработки. Рассмотрены методы, основанные на применении кремнеземного сорбента, магнитных частиц, сочетании кремневой адсорбции и органических растворителей, спин-колонок с мембраной из кремнезема.

Сравнительный анализ методов экстракции бактериальной ДНК представляет собой фундаментальную основу для разработки инновационных подходов в контроле качества молочной продукции. Разработка оптимального протокола выделения нуклеиновых кислот приведет к созданию высокочувствительных экспресс-методов молекулярно-генетического анализа, способных заменить трудоемкие и длительные традиционные микробиологические исследования. Внедрение подобных технологий позволит проводить

анализ определения подлинности молочной продукции, т. е. соответствие заявленному микробному составу, а также выявлять нарушения в технологических процессах (контаминация продукта, нарушение режимов термической обработки и т. д.). Кроме того, зная микробный состав, можно разрабатывать синтетические микробные консорциумы и новые функциональные продукты на их основе.

Объекты и методы исследования

Объекты исследования – сырое козье молоко (Козья ферма САТИ, с. Васильевское) и сухое козье молоко (СБТ-АГРО, с. Черкассы), сыр из козьего молока (Городецкая сыроварня, д. Курцево), а также продукты, полученные из козьего молока в лабораторных условиях: пастеризованное молоко и кисломолочный продукт на йогуртовой закваске (йогурт). Йогуртовая закваска из коллекции культур микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ) на основе культур микроорганизмов из коллекции ВНИМИ: *Streptococcus thermophilus* (штамм бкб) и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (штамм L37/7).

Подготовка образцов. Пастеризацию сырого козьего молока проводили при температуре 90 ± 2 °С в течение 5 мин на водяной бане.

Для приготовления кисломолочного продукта (йогурт) в предварительно пастеризованное и охлажденное до температуры 4 ± 2 °С молоко добавляли 5 % жидкой йогуртовой закваски. Затем смесь подвергали инкубации при температуре 40 ± 2 °С в течение 4 ч в термостате (Смоленское СКТБ СПУ, Россия). По окончании инкубации кисломолочный продукт охлаждали до 25–30 °С, тщательно перемешивали и помещали в холодильную камеру для хранения при 4 ± 2 °С.

Пробоподготовка образцов. Из образцов сырого и пастеризованного козьего молока, а также кисломолочного продукта на йогуртовой закваске (йогурт) объемом 2 мл получали осадок клеток путем центрифугирования на высокоскоростной мини-центрифуге Microspin 12 (Biosan, Латвия) при ускорении 10000 g в течение 5 мин и удаления надосадочной жидкости. Образцы сухого козьего молока и козьего сыра не требовали пробоподготовки, их навески составляли 100 и 400 мг соответственно.

Экстракция ДНК. Нуклеиновые кислоты выделяли в соответствии с инструкциями производителей с помощью следующих наборов: «ДНК-Сорб-С-М» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора), «ДНК-Экстран-2» (СИНТОЛ, Россия), «К-Сорб» (СИНТОЛ, Россия), «Сорб-ГМО-Б» (СИНТОЛ, Россия), «ГМО-МагноСорб» (СИНТОЛ, Россия).

Анализ уровня фрагментации ДНК проводили разделением ампликонов в 1 % геле агарозы I (VWR International LLC, США), окрашенном раствором бро-

мистого этидия (PanReac Applichem, Испания), при напряжении электрического поля 7 В/см геля в течение часа. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали 1 kb DNA Ladder (ЗАО «Евроген», Россия). Результаты гель-электрофореза визуализировали с помощью системы гель-документирования E-Box-CX5.TS (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе Super-Bright (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

Измерение концентрации ДНК. Концентрацию препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов «QuDye BR для определения количества двухцепочечной ДНК» (Lumiprobe RUS Ltd., Россия), объем исследуемой аликвоты составлял 5 мкл.

Оценка чистоты нуклеиновых кислот. Чистоту выделенных нуклеиновых кислот определяли путем измерения оптической плотности проб на микроспектрофотометре Nano-500 (Allsheng, Китай) при длинах волн 230, 260 и 280 нм. Объем пробы составил 2 мкл.

Проведение ПЦР. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов 16S рРНК бактерий опубликованы в работе Marsh *et al.* [16].

Состав реакционной смеси для ПЦР включал 1 мкл матрицы выделенной ДНК, 5 мкл реакционной смеси 5X ScreenMix (Евроген, Россия), 10 пмоль прямого праймера, 10 пмоль обратного праймера и 17 мкл деионизированной воды (Евроген, Россия). Амплификация проводилась на приборе MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) следующим образом: первичная денатурация при температуре 94 °С в течение 10 мин, затем 35 циклов амплификации (денатурация ДНК при 94 °С в течение 1 мин, отжиг праймеров при 52 °С 1 мин, элонгация цепей ДНК при 72 °С 1 мин и финальная элонгация при 72 °С 10 мин).

Электрофорез ампликонов. Фрагменты ДНК, амплифицированные в ходе ПЦР, были визуализированы с помощью гель-электрофореза в 2 % агарозном геле (VWR International LLC, США), окрашенном раствором бромистого этидия (PanReac Applichem, Испания), при напряжении электрического поля 8 В/см геля в течение часа. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Результаты гель-электрофореза визуализировали с помощью системы гель-документирования E-Box-CX5.TS (Vilber, Франция) на трансиллюминаторе Super-Bright (Vilber, Франция) с длиной волны 312 нм.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы MS Excel. Для оценки статистической достоверности применялся непараметрический критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты и их обсуждение

Анализ уровня фрагментации ДНК. На первом этапе работы после экстракции ДНК из исследуемых образцов молочных продуктов из козьего молока

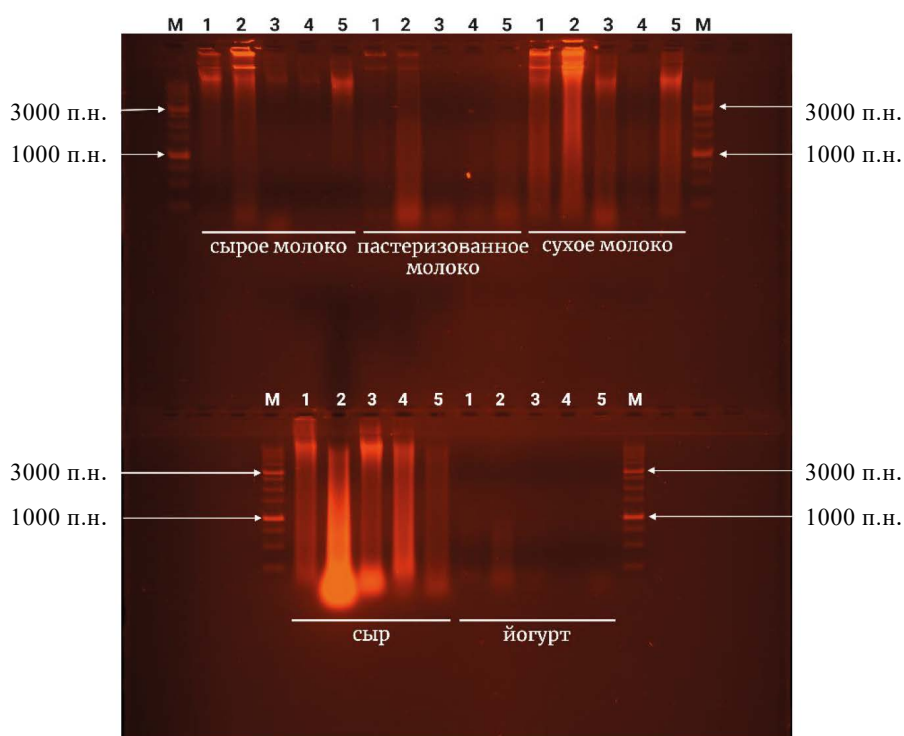
была проведена предварительная оценка фрагментации молекул при помощи электрофоретического анализа препаратов ДНК, выделенных пятью различными методами (рис. 1). Результаты показали, что наибольшее количество высокомолекулярной ДНК наблюдалось при выделении нуклеиновых кислот из сырого и сухого молока с помощью «ДНК-Сорб-С-М», «ДНК-Экстран-2» и «К-Сорб». Также наличие высокомолекулярной ДНК было зафиксировано при экстракции нуклеиновых кислот из сыра с использованием «ДНК-Сорб-С-М», «Сорб-ГМО-Б» и «Магно-Сорб». Наименьшее количество суммарной ДНК обнаружено при выделении нуклеиновых кислот из пастеризованного молока и кисломолочного продукта (йогурт) с применением наборов «Сорб-ГМО-Б», «ГМО-МагноСорб» и «К-Сорб». Кроме того, в случае выделения нуклеиновых кислот из сыра с помощью наборов «ДНК-Экстран-2» и «Сорб-ГМО-Б» наблюдались короткие фрагменты – шмеры. В случае проб, выделенных методом высаливания, отмечался шлейф, состоящий из фрагментированных нуклеиновых кислот различной длины.

Выход ДНК. В ходе дальнейшего исследования проведена оценка выхода ДНК как ключевого критерия эффективности экстракции. Результаты демонстри-

ровали значительную вариабельность выхода ДНК, получаемой коммерческими наборами, в зависимости от типа молочного продукта (рис. 2). Это указывало на определяющую роль матричных характеристик, включая содержание ингибиторов ПЦР, реологические свойства (плотность, вязкость), а также концентрацию бактериальных и соматических клеток.

Установлено, что наиболее высокий выход ДНК получен при экстракции из козьего сыра – $19645,4 \pm 9003,6$ нг (рис. 2с). Наименьший выход нуклеиновых кислот наблюдался при выделении ДНК из пастеризованного козьего молока ($84,1 \pm 15,2$ нг) и йогурта ($66,7 \pm 4,7$ нг) (рис. 2b, d).

Большой выход ДНК из сыра был связан с высоким содержанием в нем микроорганизмов, которые активно размножаются в процессе ферментации и созревания продукта. Также для изготовления сыра требуется значительно больше молока, чем для других молочкопродуктов, что изначально приводит к увеличению количества соматических клеток и ДНК. Однако образцы сыра требуют более агрессивного лизиса микробных клеток и тщательной предварительной очистки от жировой составляющей. Применение набора «К-Сорб» в соответствии с оригинальным протоколом экстракции привело к меньшему выходу ДНК из сыра



Примечание: М – маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder; 1 – ДНК-Сорб-С-М; 2 – ДНК-Экстран-2; 3 – Сорб-ГМО-Б; 4 – ГМО-МагноСорб; 5 – К-Сорб

Рисунок 1. Электрофореграмма результатов анализа уровня фрагментирования ДНК из козьего молока и продуктов его переработки

Figure 1. Electropherogram of DNA fragmentation from goat milk and its products

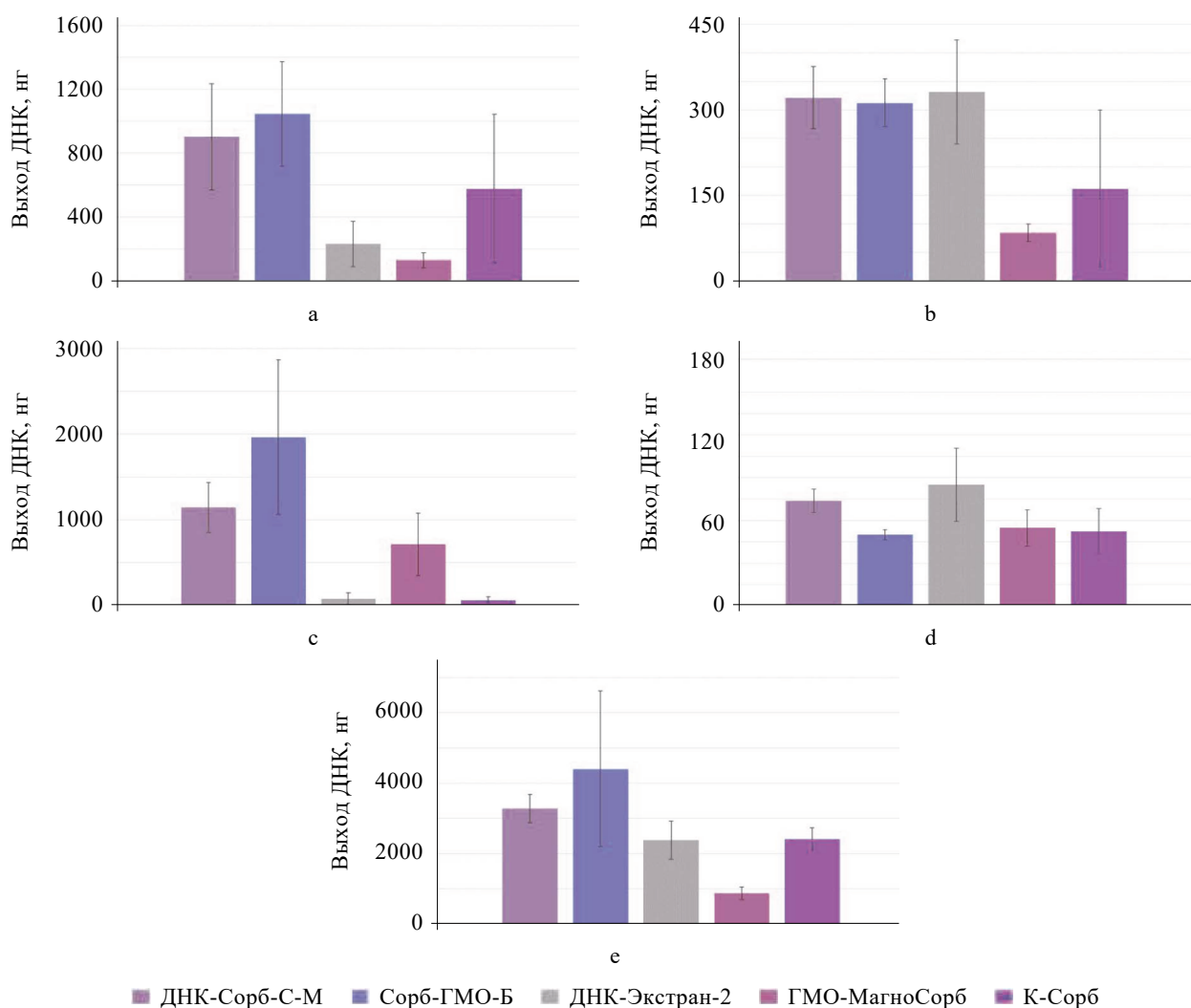


Рисунок 2. Средние значения выхода суммарной ДНК из козьего молока и продуктов его переработки, выделенной пятью методами: а – сырое молоко, б – пастеризованное молоко, с – сыр, d – йогурт, e – сухое молоко

Figure 2. Total DNA yield from goat milk and its products across five identification methods: a – raw milk, b – pasteurized milk, c – cheese, d – yogurt, e – milk powder, mean values

(622,9 ± 437,2 нг), что, вероятно, обусловлено меньшей продолжительностью лизиса по сравнению с альтернативными методами, а также недостаточной очисткой образца после лизиса. Неполное удаление остатков клеток, не подвергшихся лизису, и липидных компонентов спровоцировало обструкцию пор кремневой мембраны, снизив эффективность связывания нуклеиновых кислот и пропускную способность для буферов, используемых на этапах удаления примесей и элюции ДНК. Данную проблему можно решить модификацией протокола, введением этапа предварительной подготовки образцов (например, применение жидкого азота для лучшего разрушения клеток), увеличением времени лизиса, что позволит снизить нагрузку на мембрану, повысив выход ДНК.

Как и в случае с образцами сыра, в йогурте активно размножились бактерии при ферментации и хранении.

Однако, несмотря на это, выход ДНК оказался низким, т. к. йогурт был приготовлен на основе пастеризованного молока, выход ДНК из которого низкий вследствие термической обработки, приводящей к деградации молекул ДНК [17, 18]. Для производства сыра также используется пастеризованное молоко, тем не менее режим пастеризации для сыра более щадящий: температура составляла 72–74 °С с выдержкой в течение 20 с. В то время как молоко для йогурта пастеризовали при температуре 90 ± 2 °С в течение 5 мин (патент RU 2 541 760 С1). Помимо этого, такой результат можно объяснить наличием экзополисахаридов, активно вырабатываемых бактериями, входящими в состав заквасочной культуры, которые негативно влияют на экстракцию ДНК [19, 20]. Кроме того, микроорганизмы в йогурте защищены коагулированными белками, также препятствующими извлечению нуклеи-

новых кислот. Увеличить выход ДНК из йогурта можно путем предварительной очистки и концентрирования бактерий перед лизисом [20]. Проблема извлечения ДНК из кисломолочных продуктов остается актуальной, особенно в контексте геномных исследований, требующих высококонцентрированные и тщательно очищенные образцы ДНК.

Среди всех исследуемых образцов наиболее высокий выход ДНК получен с помощью наборов, в основе которых лежит кремневый сорбент – «ДНК-Сорб-С-М» и «Сорб-ГМО-Б», что согласуется с результатами предыдущих исследований [7]. Результаты экстракции с использованием «Сорб-ГМО-Б» лучше, вероятно, благодаря применению органических растворителей – фенола и хлороформа. Эти вещества добавлялись в лизированные образцы для эффективного отделения и осаждения белков.

Набор «ДНК-Экстран-2», основанный на методе солевого осаждения нуклеиновых кислот, показал относительно невысокий уровень выхода ДНК, за исключением тех продуктов, из которых ДНК экстрагировалась в небольших количествах независимо от метода, как в случае выделения нуклеиновых кислот из пастеризованного молока и йогурта (рис. 2b, d).

Оценка чистоты нуклеиновых кислот. В ходе измерения коэффициентов поглощения при длинах волн 260 и 280 нм метод органической экстракции (набор «Сорб-ГМО-Б») продемонстрировал наилучшие результаты получения высокоочищенных препаратов нуклеиновых кислот из исследуемых продуктов (табл. 1).

Средние значения показателя $A_{260/280}$ при использовании данного набора были выше эталонного (~ 1.8), что говорит о надлежащем качестве выделенной ДНК с минимальным содержанием белковых загрязнений. Средние значения $A_{260/280}$ для трех видов молока: $1,96 \pm 0,05$ (сырое), $1,83 \pm 0,11$ (пастеризованное) и $1,91 \pm 0,05$ (сухое). В сыре и йогурте коэффициент $A_{260/280}$ равен

$1,92 \pm 0,15$ и $1,85 \pm 0,11$ соответственно, что также свидетельствовало о высоком качестве экстрагированных нуклеиновых кислот. При применении других коммерческих наборов в основном были получены более низкие значения коэффициента $A_{260/280}$.

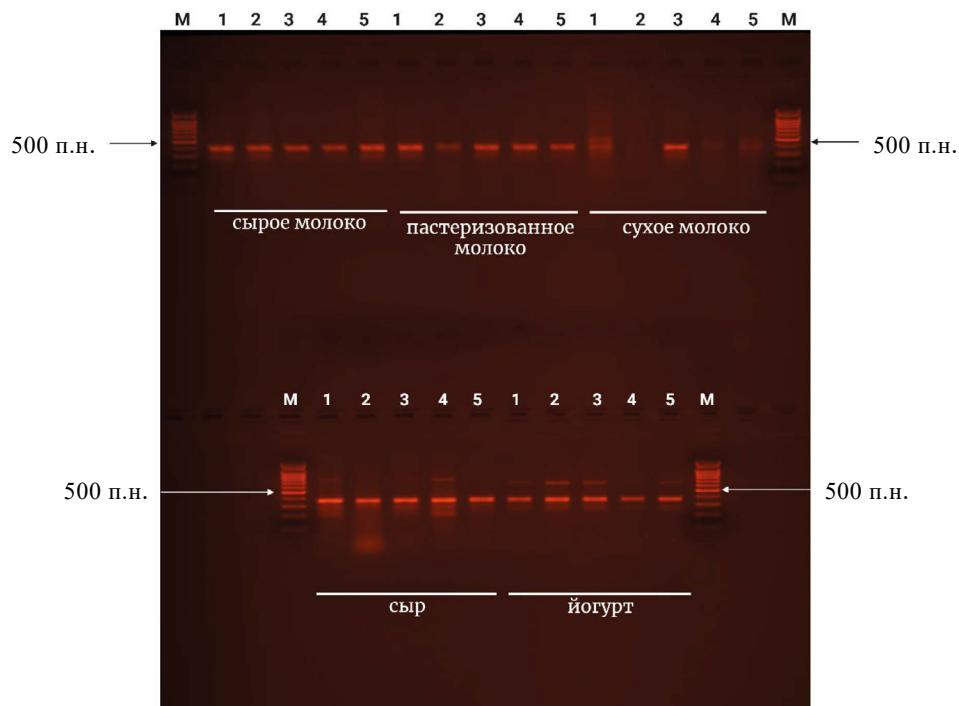
Определение коэффициента $A_{260/230}$ показало, что набор «Сорб-ГМО-Б» также позволил получить более высокоочищенные образцы, указывая на качественное удаление органических загрязнителей. Средние значения коэффициента $A_{260/230}$: $0,87 \pm 0,56$ (сырое молоко), $1,15 \pm 0,38$ (пастеризованное молоко), $1,76 \pm 0,36$ (сухое молоко), $1,72 \pm 0,63$ (сыр) и $0,48 \pm 0,22$ (йогурт). Второе место по степени очищения занял набор «ДНК-Сорб-С-М». Наборы «ДНК-Экстран-2», «ГМО-МагноСорб» и «К-Сорб» продемонстрировали более низкие значения $A_{260/230}$ после экстракции и очистки препаратов ДНК.

Электрофорез ПЦР-продуктов. Суммарная ДНК, выделенная из образцов молочных пищевых матриц, была исследована методом ПЦР с использованием праймеров, комплементарных участку бактериальных генов 16S рРНК V4-V5. Все коммерческие наборы позволяли успешно выделять ДНК микробных сообществ из исследуемых образцов молочных продуктов, за исключением сухого молока. Отсутствие целевых ампликонов размером 408 п.о. в исследуемых образцах могло быть связано с комплексным воздействием технологических процессов, применяемых при производстве продукта (рис. 3). В частности, пастеризация и термическая сушка способны индуцировать фрагментацию высокомолекулярной ДНК, что делало амплификацию протяженных участков генома невозможной. Дополнительным фактором, ограничивающим эффективность ПЦР, могла выступать деградация нуклеиновых кислот на этапе экстракции. Подтверждением гипотезы о фрагментации ДНК послужила успешная амплификация коротких фрагментов D-петли митохондриальной ДНК длиной 184 п.о., что свидетельствовало о сохранности

Таблица 1. Средние значения соотношений оптической плотности $A_{260/230}$ и $A_{260/280}$ при соответствующих длинах волн в препаратах нуклеиновых кислот, выделенных из козьего молока и продуктов его переработки

Table 1. Optical density ratios $A_{260/230}$ and $A_{260/280}$ at corresponding wavelengths in nucleic acid preparations isolated from goat milk and its processed products, mean values

Набор для экстракции	Сырое молоко		Пастеризованное молоко		Сухое молоко		Сыр		Йогурт	
	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	$A_{260/280}$
ДНК-Сорб-С-М	$0,05 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,17$	$0,03 \pm 0,01$	$1,66 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,374$	$1,88 \pm 0,003$	$0,77 \pm 0,47$	$1,64 \pm 0,22$	$0,37 \pm 0,29$	$1,03 \pm 0,20$
Сорб-ГМО-Б	$0,87 \pm 0,56$	$1,96 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,40$	$1,83 \pm 0,11$	$1,76 \pm 0,37$	$1,91 \pm 0,05$	$1,73 \pm 0,64$	$1,92 \pm 0,16$	$0,49 \pm 0,22$	$1,85 \pm 0,11$
ДНК-Экстран-2	$0,60 \pm 0,48$	$1,02 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,14$	$1,30 \pm 0,19$	$0,39 \pm 0,16$	$1,34 \pm 0,25$	$0,27 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,08$	$2,02 \pm 0,03$
ГМО-МагноСорб	$0,36 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,12$	$0,58 \pm 0,245$	$1,46 \pm 0,046$	$1,36 \pm 0,33$	$1,90 \pm 0,21$	$0,21 \pm 0,05$	$1,17 \pm 0,95$
К-Сорб	$0,50 \pm 0,38$	$1,62 \pm 0,20$	$0,25 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,10$	$2,30 \pm 3,50$	$1,75 \pm 0,21$	$0,34 \pm 0,10$	$1,18 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,27$	$1,03 \pm 0,18$



Примечание: М – маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder; 1 – ДНК-Сорб-С-М; 2 – ДНК-Экстран-2; 3 – Сорб-ГМО-Б; 4 – ГМО-МагноСорб; 5 – К-Сорб

Рисунок 3. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами на 16S рРНК бактерий в 2 % агарозном геле, выделенными пятью коммерческими наборами из козьего молока и продуктов его переработки

Figure 3. PCR electropherogram with primers for bacterial 16S rRNA: 2% agarose gel in goat milk and its products across five identification methods

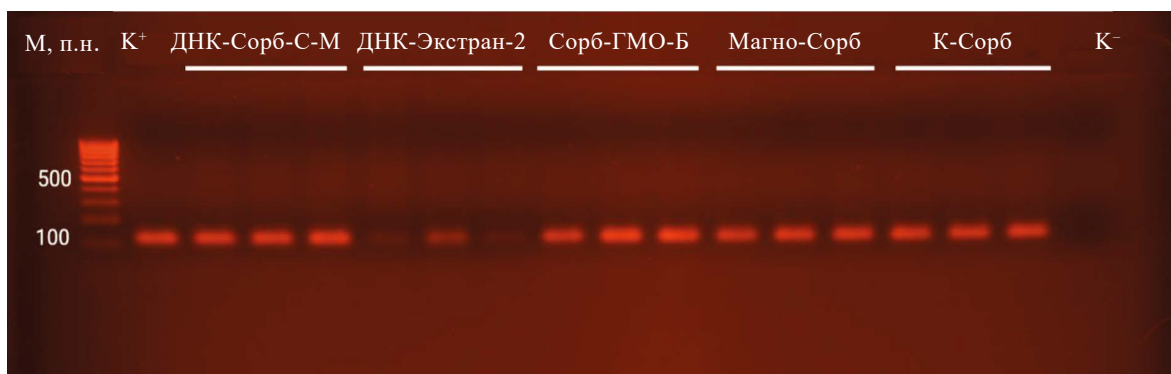


Рисунок 4. Электрофореграмма результатов ПЦР с праймерами для амплификации фрагмента D-петли митохондриальной ДНК козы (*Capra hircus*), выделенной из сухого козьего молока в 2 % агарозном геле пятью коммерческими наборами

Figure 4. PCR electropherogram with primers for amplification of D-loop fragment of *Capra hircus* mitochondrial DNA: goat milk powder in 2% agarose gel across five commercial kits

низкомолекулярных участков генома (рис. 4). Метод, комбинирующий органическую экстракцию и применение кремниевое сорбента (Сорб-ГМО-Б), позволил получить необходимое количество бактериальной ДНК для успешной амплификации и последующей детекции с помощью гель-электрофореза (рис. 3). Это могло быть связано с тем, что фенол эффективно разрушал

и удалял белки, а хлороформ не допускал попадания фенола в водную фазу, благодаря чему получали свободные от потенциальных ингибиторов ПЦР препараты ДНК с высокой степенью чистоты.

Статистическая обработка. В ходе статистического анализа результатов, полученных при выделении ДНК и измерении соотношений оптической плотно-

сти $A_{230/260}$ и $A_{260/280}$, был применен критерий Краскела-Уоллиса (H). Этот метод позволил выявить статистически значимые различия между значениями выхода ДНК, получаемыми при использовании 5 различных методов экстракции из образцов сырого (H = 9,68), пастеризованного (H = 45,89) и сухого (H = 26,60) козьего молока, а также образцов сыра (H = 39,77) и йогурта (H = 23,83). При степени свободы равной 4 и $\alpha = 0,05$ критическое значение χ^2 составило 9,5. Следовательно, нулевая гипотеза (отсутствие различий) отвергалась, т. к. расчетные значения критерия Краскела-Уоллиса больше критического значения ($> 9,5$). Статистический анализ соотношений оптической плотности $A_{260/230}$ показал наличие значимых различий между пятью методами выделения ДНК из образцов сырого (H = 101,60), пастеризованного (H = 57,33), сухого (H = 56,37) козьего молока, сыра (H = 76,41), йогурта (H = 117,84). Нулевая гипотеза, как и в случае со значениями выхода ДНК, отвергалась. Критерий Краскела-Уоллиса, примененный для анализа полученных значений оптической плотности $A_{260/280}$, также показал существенные различия для образцов сырого (H = 89,68), пастеризованного (H = 82,36), сухого (H = 62,75) козьего молока, сыра (H = 77,14), йогурта (H = 109,46). Нулевую гипотезу отвергли.

Выводы

Проведенный анализ выхода и чистоты бактериальной ДНК, полученной с помощью пяти различных методов экстракции, продемонстрировал эффективность лишь некоторых методов для работы с пищевыми матрицами из козьего молока. При исследовании образцов сухого козьего молока выявлено, что только один

из пяти методов – органическая экстракция с осаждением ДНК на кремниевом сорбенте – позволял успешно извлекать высокомолекулярную ДНК для последующей постановки ПЦР и визуализации в агарозном геле. Этот метод также показал лучшие результаты при работе с другими проанализированными продуктами из козьего молока. Близкие результаты показал метод, использующий осаждение ДНК на кремнеземном сорбенте без органической экстракции. Полученные данные говорят о возможности улучшения результатов экстракции путем внесения модификаций в стандартные протоколы, которые учитывали бы специфику молочных продуктов.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на разработку универсальных протоколов, совместимых с автоматизированными системами, а также на тестирование методов для новых категорий продукции.

Критерии авторства

Авторы в равной степени принимали участие в исследовании, написании и оформлении рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The authors are equally responsible for the research and manuscript.

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest regarding the publication of this article.

Список литературы / References

1. Ход достижения целей в области устойчивого развития. Организация Объединенных Наций. Генеральная Ассамблея Экономический и Социальный совет. [Progress towards achieving the sustainable development goals. United Nations. The General Assembly and Economic and Social Council. [cited 2024 Oct 03]. (In Russ.)] Available from: <https://unstats.un.org/sdgs/files/report/2024/secretary-general-sdg-report-2024--RU.pdf>
2. Grosso G, Mateo A, Rangelov N, Buzeti T, Birt C. Nutrition in the context of the sustainable development goals. *European Journal of Public Health*. 2020;30(1):i19–i23. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckaa034>
3. Dairy's impact on reducing global hunger. IFCN Dairy Research Network. [cited 2024 Oct 03]. Available from: <https://ifcdairy.org/dairys-impact-on-reducing-global-hunger/>
4. Глазунова О. А., Моисеенко К. В., Бегунова А. В., Рожкова И. В., Федорова Т. В. Функциональные свойства и особенности генома заквасочных пробиотических культур лактобактерий. *Актуальная биотехнология*. 2022. № 1. С. 73–77. [Glazunova OA, Moiseenko KV, Begunova AV, Rozhkova IV, Fedorova TV. Lactobacilli starter probiotic cultures: Functional and genomic properties. *Topical biotechnology*. 2022;(1):73–77. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/SLTOBG>
5. Юрова Е. А., Фильчакова С. А., Жижин Н. А. Применение метода ПЦР-анализа для определения видового состава молочного сырья. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2020. № 6. С. 16–25. [Yurova EA, Filchakova SA, Zhizhin NA. Use of PCR-analysis methods for evaluating composition and properties of milk and dairy products. *Izvestiya of Timiryazev agricultural academy*. 2020;(6):16–25. (In Russ.)] <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-6-16-25>
6. Юрова Е. А., Жижин Н. А., Фильчакова С. А. Применение молекулярно-генетических методов анализа для идентификации видовой принадлежности сырьевого состава пищевой продукции. *Вестник МГТУ*. 2020. Т. 23. № 3. С. 214–223. [Yurova EA, Zhizhin NA, Filchakova SA. Molecular genetic methods of analysis to identify the species affiliation of the raw material composition in food products. *Vestnik of MSTU*. 2020;23(3):214–223. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/HUZYAY>

7. Лазарева Е. Г., Хан А. В., Фоменко О. Ю. Исследование методов экстракции ДНК из сырого молока. Молочная промышленность. 2023. № 5. С. 115–116. [Lazareva EG, Khan AV, Fomenko OYu. Research of methods of DNA extraction from raw milk. Dairy Industry. 2023;(5):115–116. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-5-8>
8. Usman T, Yu Y, Liu C, Fan Z, Wang Y. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. Genetics and Molecular Research. 2014;13(2):3319–3328. <https://doi.org/10.4238/2014.April.29.10>
9. Benitez-Velásquez M, Cabrera R, Ríos-Tobón S, Isaza JP, Gutiérrez LA. Assessment of four different DNA extraction methodologies for the molecular detection of phage λ and *Bacillus* sp. in raw bovine milk samples. International Dairy Journal. 2024;151:105862. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105862>
10. Abdelhamed MFM, Zaid RH, Ibrahim MT, Almansoori AE. Magnetic beads carried over in extracted DNA elution from mastitis cow milk. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2024;13(1):73–80. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2024.1301.009>
11. d'Angelo F, Santillo A, Sevi A, Albenzio M. Technical note: A simple salting-out method for DNA extraction from milk somatic cells: Investigation into the goat CSN1S1 gene. Journal of Dairy Science. 2007;90(7):3550–3552. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0149>
12. Liu YF, Gao JL, Yang YF, Ku T, Zan LS. Novel extraction method of genomic DNA suitable for long-fragment amplification from small amounts of milk. Journal of Dairy Science. 2014;97(11):6804–6809. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8066>
13. Amills M, Francino O, Jansa M, Sanchez A. Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. Journal of Dairy Research. 1997;64(2):231–238. <https://doi.org/10.1017/s0022029997002161>
14. Goat milk product market overview, 2023–28. Research and Markets. The World's Largest Market Research Store. [cited 2024 Oct 03]. Available from: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5853411/goat-milk-product-market-overview-28d>
15. ALKaisy QH, Al-Saadi JS, Al-Rikabi AKJ, Altemimi AB, Hesarinejad MA, *et al.* Exploring the health benefits and functional properties of goat milk proteins. Food Science & Nutrition. 2023;11(10):5641–5656. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3531>
16. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. PLOS One. 2013;8(7):e69371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069371>
17. Bhojar L, Mehar P, Chavali K. An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. Egyptian Journal of Forensic Sciences. 2024;14:15. <https://doi.org/10.1186/s41935-024-00389-y>
18. Хан А. В., Коваль Д. Д., Лазарева Е. Г., Фоменко О. Ю. Сравнительный анализ симплексной и дуплексной ПЦР для выявления фальсификации козьего молока и продуктов его термической обработки. Food Metaengineering. 2024. Т. 2. № 3. С. 12–24. [Khan AV, Koval DD, Lazareva EG, Fomenko OYu. Comparative analysis of simplex and duplex PCR for detection of adulteration of goat milk and its heat-treated products. Food Metaengineering. 2024;2(3):12–24. (In Russ.)] <https://doi.org/10.37442/fme.2024.3.63>
19. Huang X, Duan N, Xu H, Xie TN, Xue YR, и др. Выделение ДНК из грибов с высоким содержанием полисахаридов с использованием СТАВ-PEG. Молекулярная биология. 2018. Т. 52. № 4. С. 718–726. [Huang X, Duan N, Xu H, Xie TN, Xue YR, *et al.* STAB-PEG DNA extraction from fungi with high contents of polysaccharides. Molecular Biology. 2018;52(4):718–726. (In Russ.)] <https://doi.org/10.1134/S0026898418040080>
20. Lick S, Keller M, Bockelmann W, Heller KJ. Optimized DNA extraction method for starter cultures from yoghurt. Milchwissenschaft. 1995;51(4):183–186.