نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲٤، پاییـز ۱۳۹٦
ص‌ص: ٤٥~٥٠

تشخیص تقلب در شیر شتر به روش PCR

- **علی زواری**
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **مریم ترابی** (نویسنده مسئول)
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **مهران قائمی بافقی**
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **مرجان رحمان مشهدی**
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **محمدرضا بهروزیان**
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **مجید روحانی نژاد**
  اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی
- **سعید زیبائی**
  دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق، بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، مشهد ،ایران
  شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۰۴۵۹۱۹
  Email: a_btrf@yahoo.com

چکیده:

تقلبات در شیر و گوشت شتر یک مشکل شایع در بازار خرده فروشی است. این مطالعه با هدف بررسی اعتبار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) برای تشخیص تقلبات افزودن شیر سایر دام‌ها در شیر شتر می‌باشد. ابتدا طراحی پرایمر بر اساس ژن D-Loop میتوکندریایی تشخیص تقلبل در شیر شتر با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) صورت گرفت. قطعه باندی با اندازه حدود ٤۳۰ جفت باز در شتر بدون هیچ واکنش متقاطعی تولید شد. با توجه به احتمال اختلاط شیر شتر با شیر گاو، گوسفند و بز به کمک پرایمرهای اختصاصی هر گونه از دام‌ها، آزمایش PCR بر روی DNA هر گونه به طور جداگانه استفاده گردید ودر مخلوط شیر شتر با هر یک از موارد فوق به طور جداگانه و نیز به صورت Multiplex PCR انجام گرفت. نتایج آزمایش نشان‌دهنده وجود قطعات مختلف درگونه‌های مختلف در شیر مخلوط می‌باشد که در مورد گاو قطعه ۲٤۷، در گوسفند ۳٦۳ ودر بز ۱٥۷ می باشد. توجه به نتایج تحقیق فوق نشانگر توانایی روش PCR در تشخیص تقلبات در شیر بوده و می‌تواند ابزار مفیدی در شناسایی تقلبات واطمینان خاطر مصرف‌کنندگان شود.

واژه‌های کلیدی: روش PCR ، تقلبات ، ژن میتوکندریایی، پلیمراز اختصاصی

Applied Animal Science Research Journal No 24 pp: 45-50

Identification of Adulteration With Camel Milk Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay

By: M.Khaemi Bafghi, M. Rahman Mashahdi, M.B. Behrozian, M. Rohani-nejad, A. Zavare, M. Toabi, S. Zibaei

1,2,3,4,5,6 Doctor of Veterinary Medicine. Mashad. Razavi Khorasan. 7 Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Mashhad, Iran

Meat species adulteration is a common problem in the retail market. This study investigated the validity of polymerase chain Reaction (PCR) to detect the adulteration of camel milk. The primer pair was designed based on mitochondrial D-Loop gene for detection of adulteration of camel milk in dairy and meat products by polymerase chain reaction (PCR). Amplification of 430-bp DNA fragments was observed from camel, with any cross-reaction with cattle, sheep and goat. Regarding the possibility of camel milk mixed with cow's milk, sheep and goat, with specific primers PCR on DNA testing any of the animals were used for each species separately and camel milk mixed with each of these separately as well Multiplex PCR was performed for them. The results showed that different parts of different species in the milk mixture is about 247 fragment for cattle, 363 for sheep and 157 for goats. This results of the above study demonstrates the ability of PCR method for detection of adulteration in milk and can be useful tools in fraud detection and assurance for consumers. The developed PCR assay was found to be specific for camel and could be useful tool for detection of milk adulteration.

Key words: Specific PCR assay, Adulteration, Mitochondrial gene, Specific polymerase.

مقدمه

شناسایی و تفکیک مواد غذایی حاصل از گونه‌های مختلف حیوانی و گیاهی مساله بسیار مهمی برای ارزیابی ترکیبات غذایی و دادن اطلاعات صحیح به مصرف‌کننده است. مقررات برچسب‌زنی مواد غذایی نیازمند این است که گوشت و شیر دام‌های گوناگون در محصولات گوشتی به درستی و با دقت به مصرف‌کننده اعلام شود. این امر منجر به پیدایش روش‌های قابل اعتماد و مخصوص برای تعیین شیر وگوشت گونه‌های حیوانی در محصولات مختلف غذایی شده است. زیرا این محصولات در طی فرآوری خرد شده و با ترکیبات دیگر مخلوط می‌شوند. شاید صنایع شیر و گوشت بیشترین امکان تقلب را در بین گروه‌های مختلف مواد غذایی داشته باشند. زیرا که مواد اولیه پس از مخلوط و یکنواخت شدن، در ظاهر قابل شناسایی نیستند.

جنبه‌های مختلفی مثل منبع، قیمت، عوامل مذهبی، سیستم‌های تولیدی و ایمنی بر مقبولیت شیر و گوشت توسط مصرف‌کننده اثر می‌گذارند. تقاضا و قیمت با توجه به منابع حیوانی متنوع است. جایگزینی گوشت یا شیر گران‌تر با منبع ارزان‌تر یکی از مهم‌ترین مشکلات بزرگ صنعت است. شناسایی منشاء گوشت گونه‌های حیوانی خصوصاً جهت آنالیز مواد غذایی و همچنین رعایت برخی از مقررات مذهبی بسیار مهم است. اصطلاح "گوشت گونه‌های حیوانی[1]" به طیف گسترده‌ای از گونه‌های حیوانی شامل پستانداران، پرندگان و حیوانات دریایی اشاره دارد (Pattersan, 1985).

روش‌هائی براساس جداسازی و شناسائی پروتئین، برای شناسایی تقلب در محصولات دامی شامل شیوه‌های مختلف الکتروفورتیکی

[1] Meat species

مثل (IEF) isoelectric focusing، dodecyl sulfate، polyacrylamide sodium و HPLC به‌کار میرود (Craig, Ritchie and Mackie, 1995; Schonherr, 2002). روش‌های مذکور برای مخلوط‌های خام و یا فرآوری شده شیر وگوشتی و شناسایی گونه‌ها در محصولات حرارت‌دیده مناسب نمی‌باشد. زیرا روش‌های مبتنی بر شناسائی پروتئین وابسته به بافت بوده و در اثر حرارت بافت تخریب شده و باعث دناتوره شدن پروتئین می‌شود. بنابراین روش‌های آنالیتیکی مبتنی بر پروتئین و DNA مورد نظر قرار گرفته است (Meyer and Candrian, 1996; Meyer, *et al.*, 1995). همین‌طور به روش‌های مولکولی مثل PCR توجه ویژه‌ای شده است، به دلیل این‌که DNA مولکول نسبتاً پایداری است و حتی اگر به شکل قطعه‌ای باشد خیلی بهتر قادر به مقاومت در برابر فرایند حرارتی است (Arslan, Irfan and Mehmet, 2006) . بنابراین به‌عنوان روش‌های مؤثر برای شناسایی محصولات گوشتی حاصل از گونه‌های مختلف پستانداران و ماکیان به‌کار برده شده‌اند (Ebbehoj and Thomsen, 1991[a] and 1991[b]). برای این موضوع روشهائی از به‌کارگیری آزمون‌هائی مانند SSCP، RAPD–PCR، RFLP یا توالی‌یابی Multiplex PCR، real-time PCR نیز گزارش شده است (Bottero, *et al.*, 2003; Dalmasso, *et al.*, 2004; Fajardo, *et al.*, 2006; Che Man, *et al.*, 2007; Matsunga, *et al.*, 1999) . به‌علاوه در مطالعات اخیر، روش PCR اختصاصی خاص گونه‌ها برای اعتبارسنجی شیر، گوشت و فرآورده آن‌ها براساس DNA میتوکندریایی توسعه یافته است (Doosti, *et al.*, 2014; Maskova and Paulickova, 2006).

بدین منظور در این تحقیق روش PCR اختصاصی گونه‌ها با کمک پرایمرهای خاص گونه‌های (شتر، بز، گوسفند و گاو) برای شناسایی منشاء شیر در این دام‌ها به کار برده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از عرضه‌کنندگان شیر شهر مشهد، ۱۰ نمونه شیر جمع‌آوری و علامت‌گذاری شدند. به‌عنوان شاهد نمونه‌هائی از شیر شتر، بز، گوسفند وگاو تایید شده، تهیه شد. تمام نمونه‌ها در دمای۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگه‌داری شدند.

استخراج DNA

برای آماده‌سازی نمونه‌های شیر، ابتدا چربی آن‌ها به وسیله سانتریفوژ در دور g×۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه استخراج شد. سپس از محلول بدون چربی برای استخراج DNA به کمک کیت آماده‌سازی High Pure PCR Template استفاده شد. به ۲۰۰ میکرولیتر نمونه چربی‌گیری شده، ۲۰۰ میکرولیتر Tissue Lysis buffer و ۴۰ میکرولیتر پروتینازK[2] افزوده گشت و سپس خوب مخلوط شد و به مدت ۱ ساعت در ۵۵° C انکوبه قرار گرفت. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر Binding Buffer به لوله‌ها اضافه و مخلوط شد و در ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول[3] به موارد فوق اضافه و همه مخلوط شدند و سپس به لوله‌های فیلتردار مخصوص کیت منتقل گردیدند. مخلوط حاصله به مدت ۱ دقیقه با دور g×۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول زیرین دور ریخته شد و مجدد به لوله فیلتردار بالا ۵۰۰ میکرولیترInhibitor removal buffer افزوده و به مدت ۱ دقیقه با دور g×۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پس از دور ریختن محلول زیرین، دوبار۵۰۰ میکرولیترWash buffer به لوله فیلتردار افزوده شد و دوباره به مدت ۱ دقیقه با دور g×۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در انتها لوله فیلتردار را به صورت خالی با دور بالا (g×۱۳۰۰۰) به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ نموده تا باقیمانده Wash buffer هم خارج شود و DNA پاکسازی شده داخل فیلتر خشک شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر Elution Buffer که قبلا در دمای ۷۰°C گرم شده بود را در لوله فیلتردار ریخته و به مدت ۱ دقیقه با دور g×۸۰۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. محلول پایینی حاوی DNA برای آزمایش PCR استفاده شد.

[2] Proteinase K
[3] Isopropanol

مقدار غلظت و کیفیت DNA توسط دستگاه نانودراپ[4]، بررسی و نتایج آزمایش کمی بر روی DNA استخراج شده بیانگر این بود که میزان جذب محلول DNA در محدوده ۲- ۱/۸ قرار دارد که حاکی از مناسب بودن DNA استخراج شده برای انجام واکنش PCR بود.

به‌کارگیری روش PCR

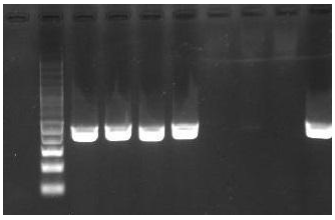
واکنش PCR جهت تعیین اختصاصی بودن پرایمرهای ویژه شیرگونه‌های گاو، شتر، بز و گوسفند مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، PCR اختصاصی با پرایمر خاص هر گونه و همراه با DNA همان گونه انجام شد. برای اطمینان از عدم واکنش متقاطع[5] پرایمرها با گونه‌های مورد مطالعه، پرایمر اختصاصی هریک ازحیوانات با DNA اختصاصی هرگونه طی واکنش PCR ارزیابی شد.

سپس واکنش نهایی PCR بر روی نمونه‌های DNA جدا شده از شیر به صورت Simplex PCR انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر Amplicon Master Mix، ۱ میکرولیتر از پرایمرهائی با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۵۰ نانوگرم از DNA نمونه‌های استخراج شده انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر[6] طبق چرخه دمایی مرحله دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه برای ۳ دقیقه انجام گرفت. سه چرخه دیگر به‌صورت ۹۴ درجه برای ۴۵ ثانیه، ۶۵ درجه برای ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد شامل بافرTBE X1 بارگزاری شد و توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید. پرایمر اختصاصی گاو، گوسفند، بز و شتر به‌ترتیب سبب تکثیر قطعات ۲۷۴، ۳۳۶، ۱۵۷ و۴۳۰ جفت باز شدند. جهت تشخیص واکنش متقاطع DNAهای گونه گاو و گوسفند با پرایمر اختصاصی گونه غیرهدف، واکنش PCR با DNA غیرهدف گونه‌ها انجام گردید که اختصاصی بودن پرایمر هر کدام از گونه‌ها تایید شد. این آزمایش چند بار تکرار شد. نتایج در تمام آزمایش‌ها یکسان بود که نشان‌دهنده تکرارپذیر بودن این آزمایش است.

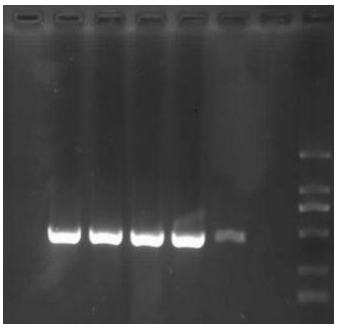
نتایج

نتایج حاصل از PCR با پرایمرهای اختصاصی نشان دادند که در نه مورد از شیرهای مورد مطالعه شیر خالص شتر و یک مورد مخلوط شیر گاو و شتر تشخیص داده شدکه نمونه آخر به‌عنوان شیر شتر تقلبی محسوب می‌شود. البته اظهارنظر در مورد شیرهای عرضه شده در سطح شهر نیاز به نمونه‌برداری و بررسی بیشتر دارد.

نتایج واکنش PCR انجام گرفته با DNAهای استخراج شده از ۱۰ نمونه شیر دریافتی همراه با پرایمرهای اختصاصی مختص ژن‌های میتوکندریایی به‌ترتیب در اشکال ۱ و۲ قابل مشاهده هستند .



شکل ۱- Simplex PCR با پرایمرهای اختصاصی شتر جهت تکثیر قطعه bp ۴۳۰، ژن D-Loop میتوکندریایی روی ژل آگارز ۲ درصد.



شکل۲- Simplex PCR با پرایمرهای اختصاصی گاو جهت تکثیر قطعه bp ۲۷۴، ژن cytochrome b میتوکندریایی بر روی آگارز ۲ درصد.

[4] Epoch, Biotech, BioTek Instruments, Inc
[5] Cross reaction
[6] Primus, Germany

بحث و نتیجه‌گیری

اخیرا نگرانی‌ها از وجود تقلبات در محصولات گوشتی و لبنی افزایش یافته است، به این دلیل نیاز به شناسایی محتویات و تشخیص گونه دامی تولیدکننده این محصولات برای جلوگیری از تقلبات بیشتر احساس می‌شود. پلی‌مورفیسم DNA میتوکندریایی به‌طور گسترده برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود. داده‌های DNA میتوکندریایی می‌تواند به شناسایی گونه‌های حیوانی از قطعات بافت کمک کند. توالی‌های ناقص و کامل DNA میتوکندریایی در خیلی از حیوانات تشخیص داده شده است (۲۷). نشان داده شده که مقاومت حرارتی و تعداد کپی‌های زیاد DNA میتوکندریایی در بافت گوشت قطعات DNA را حفظ می‌کند تا به اندازه کافی به وسیله PCR تکثیر شود. به‌حالتی‌که تعداد کپی‌های بالای DNA میتوکندریایی، کوچک، دورشته‌ای و حلقوی بودنشان در سلول، تضمین‌کننده کمیت زیاد و کافی محصول PCR حتی در مقادیر کم نمونه گوشت خام یا فرآیند شده، است. لذا برای شناسایی فرآورده‌های دامی از مبادی گونه‌های مختلف مطلوب شناخته شده‌اند (Girish, *et al.*, 2003).

در سال‌های اخیر با به‌کارگیری روش PCR، مطالعاتی در زمینه بررسی تقلبات محصولات لبنی وگوشتی بر پایه تکثیر نواحی مختلف ژنوم میتوکندریایی صورت گرفته است. به عنوان مثال، شیر گاو در شیر بوفالوها و در پنیر موزارلا که با شیر بوفالو تولید می‌شود به کمک PCR و پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن 12srRNA بررسی شده است (Lo´pez-Calleja, *et al.*, 2005); سما و همکاران (۲۰۰۹) با پرایمرهای اختصاصی ژن 12srRNA میتوکندریایی به شناسایی تقلب شیر گاو در شیر بوفالو پرداختند (Samah, *et al.*, 2009). در بررسی‌هائی‌جهت شناسایی تقلب شیر و پنیر گاو و بوفالو، شیر گاو در شیر بز به‌ترتیب از پرایمرهای اختصاصی D-Loop وسیتوکروم b میتوکندریایی استفاده کردند (Sachinandan, *et al.*, 2011; Kotowicz, Adamczyk and Bania, 2007).

به‌علاوه پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 1716srRNA و 12srRNA در واکنش Multiplex-PCR جهت شناسایی شیر گاو، بز و گوسفند در محصولات لبنی مورد استفاده قرارگرفته است(Meyer, *et al.*,1995). در مطالعه‌ای مشابه نیز ماسکوا و پائلیکووا (۲۰۰۶)، به بررسی حضور شیر گاو در پنیرهای تولیدی از شیر بز و گوسفند در محصولات چند شرکت اروپایی بر پایه تکثیر ژن سیتوکروم b میتوکندریایی پرداختند (Maskova and Paulickova, 2006).

در تحقیق حاضر سعی شده است روش دقیق، سریع، مطمئن و با تکرارپذیری مناسب برای شناسایی شیر گاو، شتر و گوسفند در محصولات لبنی معرفی شود. برای این منظور از DNA میتوکندریایی استفاده شد. به دلیل احتمال شکسته شدن مولکول DNA در طی فرآیند پاستوریزه شدن و استریلیزاسیون، سعی شده است پرایمرهای با طول قطعات‌کوتاه بکار رود تا شانس تکثیر و ردیابی حضور ژنوم اختصاصی موردنظر در طی واکنش PCR افزایش یابد. با بررسی‌های نرم‌افزاری، ناحیه مشترک برای دو گونه هدف برای پرایمرها پیدا نشد و این مسئله با آزمایش‌های PCR اولیه تأیید گردید. ده نمونه DNA استخراج شده با موفقیت برای هر چهار گونه ذکر شده مورد شناسایی قرار گرفتند وبدون هیچ واکنش متقاطعی قطعات DNA شیر شتر در تمامی ده نمونه تکثیر یافت که یک مورد تقلب مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که روش PCR اختصاصی گونه‌ها، روشی مطمئن، سریع، قابل اعتماد، ارزان و تکرارپذیر برای بررسی تقلبات در محصولات لبنی است و انتظار می‌رود که این روش ابزار آزمایشگاهی مناسب و مفیدی برای شناسایی محصولات مبنی بر گونه‌های مختلف دامی به خصوص برای ردیابی شیر آن‌ها درآینده باشد.

منابع:

Arslan, A., Irfan, O.I. and Mehmet, C. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. Meat Science, 72: 326–330.

Bottero, M.T., Dalmasso, A., Nucera, D., Turi, R.M., Rosati, S., Squadrone, S., Goria, M. and Civera, T. (2003). Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. Journal of Food Protection, 66: 2307–2312.

Che Man, Y.B., Aida, A.A., Raha, A.R. and Son, R. (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification. Food Control, 18: 885–889.

Craig, A., Ritchie, A.H. and Mackie, I.M. (1995). Determining the authenticity of raw reformed breaded scampi (Nephrops norvegicus) by electrophoretic techniques. Food Chemistry, 52: 451–454.

Dalmasso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S. and Bottero, M. (2004). A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. Molecular and Cellular Probes, 18: 81–87.

Doosti, A., Ghasemi Dehkordi, P. and Rahimi, E. (2014). Molecular assay to fraud identification of meat products. Journal of Food Science and Technology, 51(1):148-152.

Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. (1991[a]). Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. Meat Science, 30: 221–234.

Ebbehoj, K.F. and Thomsen, P.D. (1991[b]). Differentiation of closely related species by DNA hybridization. Meat Science, 30: 359–366.

Fajardo, V., GonzaLez, I., Lo´pez -Calleja, I., Martian, I., Hernandez, P.E., Garciaa, T.R. and Martian, R. (2006). PCR–RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). Agricultural and Food Chemistry, 54: 1144–1150.

Girish, P.S., Anjaneyulu, A.S.R., Viswas, K.N., Anand, M., Rajkumarb, N., Shivakumar B.M. and Bhaskar, S. (2003). Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. Meat Science, 66: 551–556.

Kotowicz, M., Adamczyk, E. Bania, J. (2007). Application of a Duplex-PCR for detection of cows'milk in goats'milk. Annals of Agricultural and Environmental Medicine; 14: 215-18.

Lo´pez-Calleja, I., Gonza´lez, A. V. Fajardo, M. A. Rodrı´guez, P. E. Herna´ndez, T. Garcı´a, *et al.*, (2005). PCR detection of cows'milk in water buffalo milk and mozzarella cheese. International Dairy Journal,15:1122–29

Maskova, E., Paulickova I. (2006). PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. Czech Journal Food Science, 24(3):127–32

Matsunga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J. and Shinmura, Y. (1999). A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. Meat Science, 51:143–148.

Meyer, R. and Candrian, U. (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29: 1–9.

Meyer, R., Hoefelein, C., Luethy, J. and Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. Journal of AOAC International, 78:1542–1551.

Pattersan, R.L.S. (1985). Biochemical identification of meat species. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 313–315.

Sachinandan, D., Biswajit, B. Shamik, P. Ayan, M. Deepak, B. Moloya, G. *et al.*, (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. Food Control, 22(5): 690-96.

Samah, F., Darwish, H. Allam, A. and Amin, A. S. (2009). Evaluation of PCR Assay for Detection of Cow's Milk in Water Buffalo's Milk. World Applied Science Journal. 7 (4): 461-67.

Schonherr, J. (2002). Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1945–1950.

▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪