

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕННОМОДИФИЦИРОВАННОЙ СОИ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОДУКЦИИ

Ш. А. Пфейфер, аспирант

Ф. Я. Рудик, доктор технических наук, профессор

О. С. Фоменко, кандидат технических наук, доцент

О. М. Буттаев, кандидат технических наук, доцент

*Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии
им. Н. И. Вавилова*

E-mail: ShtefanPfeifer@yandex.ru

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, генетически модифицированный организм, соя, генетически модифицированные организмы в сое.

Реферат. *Представлены результаты исследования методов идентификации генетически модифицированной сои с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Целью исследования являлся контроль качества растительного сырья – зерна сои – методом ПЦР. В процессе работы применялись современные лабораторные приборы («Real time CFX Connect», «Rotor Gene 6000») и специализированные реагенты производства «Вет-Фактор». Методика предусматривала три этапа: отбор проб, выделение ДНК, проведение реакции и анализ результатов. Экспериментально установлено, что исследуемые образцы сои имеют различия по содержанию в них питательных веществ. В генномодифицированной сое отмечено снижение уровня протеина, жира, клетчатки и фосфора на 3–12 % по сравнению с нативной. При этом содержание кальция в ГМ-сое выше на 11 %. На основании полученных данных авторы рекомендуют использовать нативную сою для производства продуктов питания, а ГМ-сою – преимущественно для кормопроизводства. Проведенные исследования подтвердили эффективность использования ПЦР-метода для идентификации ГМО в растительном сырье. Полученные данные могут быть использованы для совершенствования системы контроля качества сельскохозяйственной продукции и обеспечения продовольственной безопасности.*

APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC METHODS FOR IDENTIFICATION OF GENETICALLY MODIFIED SOY BEANS IN ORDER TO IMPROVE THE QUALITY AND SAFETY OF PRODUCTS

Sh. A. Pfeiffer, PhD student

F. Ya. Rudik, Doctor of Technical Sciences, Professor

O. S. Fomenko, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor

O. M. Buttaev, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor

Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov

Keywords: polymerase chain reaction, genetically modified organisms, soybeans, genetically modified organisms in soybeans.

Abstract. *The article presents the results of a study of methods for the identification of genetically modified soybeans using polymerase chain reaction (PCR). The aim of the study was to control the quality of vegetable raw materials - soybeans by PCR. In the course of the work, modern laboratory devices (“Real-time CFX Connect”, “Rotor-Gene 6000”) and specialized reagents “Vet-Factor” were used. The technique included several stages: sampling, DNA isolation, reaction and analysis of the results. It has been experimentally established that the nutrient content in the studied soybean samples has differences. The genetically modified soybeans showed a decrease in protein, fat, fiber, and phosphorus levels by 3.0–12.0% compared with native soybeans. At the same time, the calcium content in GM soybeans is 11% higher. Based on the data obtained, the authors recommend using native soybeans for food production, and GM soybeans mainly for feed production. The conducted studies have confirmed the effectiveness of using the PCR method for the identification of GMOs in plant raw materials. The data obtained can be used to improve the quality control system of agricultural products and ensure food security.*

Генетически модифицированные организмы широко применяются в производстве кормов и пищевых продуктов. Для них характерны такие показатели, как устойчивость к насекомым или гербицидам, высокое содержание белка и жира. Соя является ГМ-культурой с самыми большими посевными площадями в мире [1–4]. Новые технологии редактирования генов могут иметь потенциал для создания растений, генетически модифицированных с вредным последствием, – либо в смысле их воздействия на само растение, либо с точки зрения нанесения вреда потребителям кормов и продуктов питания [10]. По поводу создания ГМО сои в науке признано несколько сценариев риска, связанных с наличием в них устойчивых к антибиотикам патогенов, возникновением синтетической биологии или возможностью смешивания не ГМО-семян с ГМО-семенами [5–8]. Существует мнение, что с развитием генетически модифицированного пищевого сырья усугубилась ситуация с продовольственной безопасностью. Эти опасения, скорее всего, связаны с недостаточными знаниями о воздействии генно-инженерно-модифицированной сои на организм человека и внешнюю среду, что требует более глубокого изучения проблемы ГМО. В настоящее время для безопасности продуктов питания необходимы более точные методы идентификации измененной ДНК, в том числе в сельскохозяйственных культивируемых растениях [15–17].

Цель исследования заключалась в проведении контроля качества растительного сырья, а именно зерна сои, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В процессе исследования применялась методика полимеразной цепной реакции. Методика предусматривает использование тест-системы производства ООО «Вет-Фактор», а именно набора реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР», обеспечивающего точное определение наличия трансгенов в анализируемых пробах.

Для проведения исследований сои использовались специализированные приборы: амплификатор, термостат для пробирок типа «Эппендорф», микроцентрифуга для пробирок, вортекс вакуумный, медицинский отсасыватель с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости, настольный бокс с бактерицидной лампой [18].

Извлечение образцов (объектов оценки) проводилось в соответствии с правилами отбора проб по государственным стандартам ГОСТ 10854–2015, ГОСТ 12430–2019 и ГОСТ Р 54705–2011, которые определяют последовательность отбора проб для однородных групп пищевой продукции.

Партии сои отбирались по 5–10 г каждая, из них формировалась объединенная проба весом 100 г. Из объединенной пробы отбиралась средняя проба весом 10 г. Перед началом анализа средняя проба растиралась до мелкодисперсного гомогенного состояния. Для выделения ДНК использовалась проба объемом 100 мкл в одноразовых микропробирках вместимостью 1,5 мл. Исследование проводилось в три этапа: экстракция НК; проведение реакции; оценка результатов исследования.

На начальном этапе эксперимента было выполнено выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты из образцов. Исследование проводилось в соответствии с требованиями инструкции по применению набора реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-1-ФАКТОР». На первом этапе образцы обрабатывались лизирующим составом. Под действием раствора происходило разрушение клеточных мембран и клеточных компонентов и, как следствие, высвобождение нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты связываются с микрочастицами сорбента и удаляются из раствора. Удаление осуществляется методом центрифугирования, после чего нуклеиновые кислоты выделяются из сорбента. Этот подход позволяет получить высокоочищенные препараты нуклеиновых кислот для дальнейших экспериментальных исследований.

Полученный раствор был свободен от ингибиторов, замедляющих реакции амплификации, и хранился при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента использования [19].

Использовались лабораторные приборы «Real-time CFX Connect» и «Rotor-Gene 6000». При проведении исследований использовались наборы готовых реагентов «Вет-Фактор», предназначенных для определения значений генномодифицированной сои выше установленных

линий в кормах для животных, пищевых продуктах, посевном материале, растениях путём амплификации ДНК. Экспериментальное исследование проводилось по следующей методике.

В пробирках для амплификации готовилась смесь, участвующая в реакции.

Общий объем пробирки составляет 25 мкл, из которых 15–20 мкл предназначены для проведения ПЦР в реальном времени. Затем добавляется 5–10 мкл исследуемого образца с выделенной ДНК, включая отрицательный и положительный контроль. Амплификация проводилась согласно программе с использованием следующих режимов: нагрев до 94–95 °С в течение 9–15 мин (1 цикл); при температуре 94–95 °С – 10–15 с (42–45 циклов); затем при температуре 59 °С – 50–60 с (42–45 циклов).

Для определения репрезентативных последовательностей в качестве флуоресцентных соединений использовались красители FAM, HEX, JOE, ROX и Cy5 в следующей последовательности:

канал FAM/Green – DP3054;

канал JOE(HEX) – DP3560043;

канал ROX/Orange – BPS-CV127-09;

канал Cy5/Red – внутренний контрольный образец [19].

Для анализа данных применялось программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager, используемое совместно с прибором «Real time CFX Connect». Окончательные результаты корректировались в зависимости от того, пересекала ли кривая флуоресценции пороговую линию в соответствующем канале. Пересечение кривой с порогом свидетельствовало о наличии значения Ct (порогового цикла) для пробы, а его отсутствие – об отрицательном результате. Достоверность экспериментальных данных проверялась посредством анализа контрольных образцов на этапах выделения и амплификации ДНК [19]. Успешность эксперимента подтверждалась наличием четких сигналов в положительном и отрицательном контроле, что гарантировало отсутствие контаминации и корректность проведения исследования.

Математическая обработка результатов исследования проводилась в программе Microsoft Excel 2010. Количественный анализ геномодифицированной дезоксирибонуклеиновой кислоты в зерне сои определялся расчетом соотношения ГМ ДНК к общему количеству ДНК опытного образца. Качественный анализ определял наличие или отсутствие трансгенов в исследуемых образцах. Для выполнения двух изолированных химических реакций в одной лабораторной емкости использовались готовые тест-системы [19]. График изменений отрицательных результатов ПЦР-опытов, подтверждающих отсутствие генно-инженерно-модифицированных семян в исследуемых образцах сои представлен на рисунке 1.

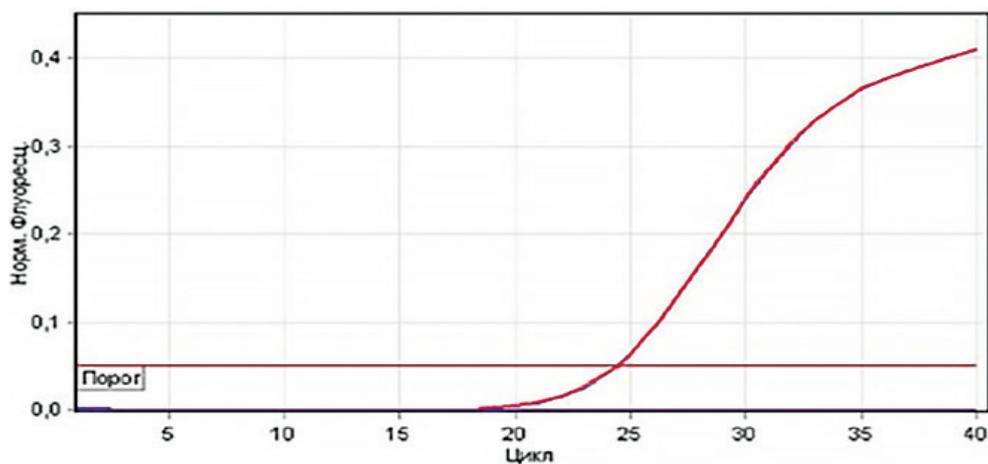


Рис. 1. Кинетическая кривая отрицательных результатов исследования частиц дезоксирибонуклеиновой кислоты сои методом ПЦР на приборе «Rotor-Gene 6000» Corbett Research, Австралия

Fig. 1. Kinetic curve of negative results of the study of soy deoxyribonucleic acid particles by PCR on the device “Rotor-Gene 6000” Corbett Research, Australia

Для интерпретации результатов ПЦР использовали значение порогового цикла (C_t). Положительным считался результат при $C_t \leq 35$, отрицательным – при отсутствии пересечения кривой с пороговой линией в течение 45 циклов амплификации.

На рисунке 1 кривая положительного контроля устремлена вверх, пересекает порог на цикле 23,5, что свидетельствует о правильной постановке реакции и отсутствию встречающихся у ГМ-сои фрагментов во всех образцах.

Мониторингом сигнала построена графическая зависимость скорости реакции ПЦР. Определено, что по оси интенсивности поглощения кванта энергии флуорофором цикл усиления имеет сигмовидную форму. На графике явно видны три этапа:

- первый, или начальный, участок, когда ПЦР продукты еще не обнаруживаются флуоресцентной меткой;
- второй участок, на котором видна взаимосвязь интенсивности поглощения кванта энергии флуорофором и цикла ПЦР;
- третий участок кривой соответствует полному насыщению.

Кривые положительного контроля имеют сигмовидную форму относительно выбранных флуорофоров: FAM–DP3054, HEX–DP3560043, ROX–BPS-CV127-09 и Cy5 (как внутренний контрольный образец). Анализ выделенной ДНК показал возрастание флуорофора канала Cy5 (внутреннего контрольного образца), что свидетельствует о правильной постановке реакции и отсутствию встречающихся у ГМ-сои фрагментов во всех образцах. Выделенные фрагменты ДНК с предположительным наличием фрагментов ГМ-сои DP3054, DP3560043 и BPS-CV127-09 соответствовали значению (0,009 %) и показаны на графике горизонтальными прямыми (рис. 1).

На рисунке 2 представлены графики изменения флуоресцентного сигнала для исследуемых образцов семян. Они демонстрируют, что при многократном увеличении копий участка ДНК с использованием тест-набора «Вет-Фактор ПЦР-ГМО-СОЯ-2-ФАКТОР» по каналу ROX (BPS-CV127-09) наблюдается положительная динамика – $C_t \leq 35$. Это свидетельствует о наличии ГМ-сои в исследуемых образцах.

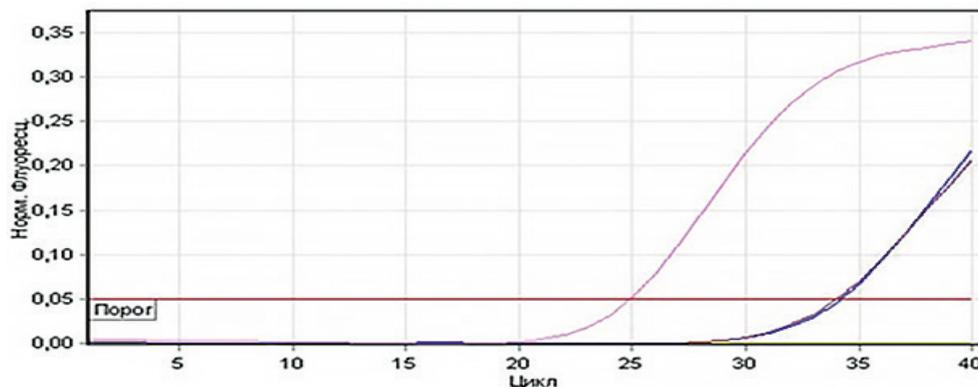


Рис. 2. Кинетические кривые результатов анализа на приборе «Rotor-Gene 6000» Corbett Research

Fig. 2. Kinetic curve of the analysis results on the device “Rotor-Gene 6000” Corbett Research

Этот график позволяет установить, присутствует ли критическое значение обнаружения генно-инженерно-модифицированной сои для исследуемого образца [19].

Результаты экспериментальных исследований считали достоверными при условии получения правильных итогов для исследуемых порогов экстракции и амплификации дезоксирибонуклеиновой кислоты. Увеличение импульса флуоресценции отмечалось только в

реакции с исследуемым образцом ДНК, полученной из семян изучаемой культуры линии BPS-CV127-09. Экспериментальным путем установлено, что на образцах ДНК сои линий DP3054, DP3560043 повышение сигнала флуоресценции не обнаружено.

Также были проведены сравнительные исследования химического состава исследуемых образцов сои (табл.). При анализе таблицы установлены незначительные различия по питательным веществам.

Таблица

Химический состав исследуемых образцов, %
Chemical composition of the studied samples, %

Показатель	Протеин	Жир	Клетчатка	Кальция	Фосфор
Соя ГМО	33,65	21,20	8,02	0,42	1,03
Соя без ГМО	35,80	22,15	8,27	0,38	1,20

В результате проведенного исследования с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и флуоресцентной детекции в реальном времени были получены важные данные о различиях между генетически модифицированной и нативной соей. Экспериментальным методом в лаборатории установлено, что в исследуемых образцах сои значимых различий по питательным веществам не определено. Особенно важно отметить снижение уровня протеина, жира, клетчатки и фосфора в ГМ-сое в диапазоне 3–12 %. При этом содержание кальция в генно-модифицированной сое превышает показатели немодифицированной сои на 11 %.

На основе полученных данных авторы рекомендуют использовать нативную сою для производства продуктов питания, а ГМ-сою – для кормопроизводства. Это заключение согласуется с современными тенденциями в пищевой и кормовой индустрии, где безопасность продуктов питания является приоритетным направлением.

Таким образом, проведенное исследование подтвердило необходимость точной идентификации ГМО в растительном сырье и позволило получить важные данные о различиях в химическом составе между модифицированной и нативной соей. Эти результаты могут быть использованы при разработке рекомендаций по применению различных видов сои в пищевой и кормовой промышленности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *ГОСТ Р 55576–2013* Корма и кормовые добавки. Метод качественного определения регуляторных последовательностей в геноме сои и кукурузы. – М.: Стандартинформ, 2015. – 9 с.
2. *ГОСТ Р 56058–2014* Корма и кормовые добавки. Методы идентификации и количественного определения ГМО растительного происхождения. – М.: Стандартинформ, 2015. – 6 с.
3. *ГОСТ Р 53244–2008* Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот. – М.: Стандартинформ, 2009. – 61 с.
4. *ISO 21571:2005* Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.
5. *Дутбайева Д. М., Кыздарбекова А. С., Касымбекова К. Б.* Генная инженерия в сельском хозяйстве // Проблемы современной науки и образования. – 2017. – № 6 (88). – С. 76–78.
6. *Кузнецов В. В.* Возможные биологические риски при использовании генетически модифицированных сельскохозяйственных культур // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 3. – С. 40–54.
7. *Александрова Е. Г., Блинова Ю. А.* Генная инженерия в сельском хозяйстве // Science and education: problems and innovations: материалы III Международ. науч.-практ. конф. Пенза, 12 февраля 2020 г. – Пенза: СамГАУ, 2020. – С. 92–94.
8. *ПЦР в реальном времени* / Д. В. Ребриков, Г. А. Саматов, Д. Ю. Трофимов, П. А. Семёнов; под ред. Д. В. Ребрикова. – 6-е изд. – М.: Лаборатория знаний, 2015. – 223 с.

9. Инструкция по применению набора реагентов «ПЦР-ГМО-СОЯ-1-ФАКТОР» для идентификации ГМ-сои линий BPS-CV127 09, DP305423, DP356043 в кормах, пищевой продукции, растительном сырье и посевном материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.
10. Шилено А. А., Митенкова А. Е. ГМО: польза для человека, вред для организма // Комплексные проблемы развития науки, образования и экономики региона. – 2014. – № 1–4. – С. 132–135.
11. Зорина В. В. Основы полимеразной цепной реакции: методическое пособие. – М.: ДНК-технология, 2012. – 80 с.
12. ГОСТ 10852–86 Семена масличные. Правила приемки и методы отбора проб. – М.: Стандартиформ, 1987. – 4 с.
13. ГОСТ 12430–66 Продукция сельскохозяйственная. Методы отбора проб при карантинном досмотре и экспертизе. – М.: Стандартиформ, 1985. – 4 с.
14. ГОСТ 13979.0–86 Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Правила приемки и методы отбора проб. – М.: Стандартиформ, 1986. – 4 с.
15. ПЦР-диагностика с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени для быстрого обнаружения *Mycoplasma hyorhynchiae* в ассоциации с *Streptococcus pneumoniae* у свиней / Е. А. Толстова, М. М. Лигидова, В. А. Агольцов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2023. – Т. 254, № 2 – С. 264–272.
16. Технологии производства сыров из сои / Ф. Я. Рудик, Н. Л. Моргунова, Н. А. Семилет, Ш. А. Пфейфер // Пищевые технологии будущего: инновации в производстве и переработке сельскохозяйственной продукции: сб. ст. международ. науч.-практ. конф. Саратов, 12–13 марта 2020 г. – Саратов: Вавиловский университет, 2020. – С. 83–85.
17. Technology for reducing urease activity in soybeans/ N. L. Morgunova, F. Y. Rudik, N. A. Semilet [et al.] // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations. Т. 862. Krasnoyarsk, 16–18 апреля 2020 г. – Institute of Physics and IOP Publishing Limited, 2020. – С. 62005.
18. Сравнение методов изотермической петлевой амплификации в режиме реального времени (LAMP) и полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР) для диагностики *Streptococcus pneumoniae* у свиней / Е. А. Толстова, В. А. Агольцов, О. Ю. Черных [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2023. – Т. 255, № 3. – С. 336–343. – DOI: 10.31588/2413_4201_1883_2_255_336. – EDN: NZACQO.
19. Исследование генома сои на наличие генетически модифицированных конструкций методом ПЦР реального времени / Л. Е. Иваченко, О. Н. Тарасова, Н. В. Мартыненко [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2022. – № 1 (221). – С. 113–119.
20. Зиновьев С. Г., Манюненко С. А., Биндюг Д. А. Особенности химического состава обычной и генномодифицированной сои // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2018. – № 4. – С. 12–15.

REFERENCES

1. ГОСТ R 55576–2013 *Korma i kormovye dobavki. Metod kachestvennogo opredeleniya regulatorynykh posledovatel'nostej v genome soi i kukuruzy* (ГОСТ R 55576-2013 Feeds and feed additives. Method for qualitative determination of regulatory sequences in soybean and corn genome), Moscow: Standartinform, 2015, 9 p.
2. ГОСТ R 56058–2014 *Korma i kormovye dobavki. Metody identifikacii i kolichestvennogo opredeleniya GMO rastitel'nogo proiskhozhdeniya* (ГОСТ R 56058-2014 Feeds and feed additives. Methods of identification and quantification of GMOs of plant origin), Moscow: Standartinform, 2015, 6 p.
3. ГОСТ R 53244–2008 *Produkty pishchevye. Metody analiza dlya obnaruzheniya geneticheski modificirovannykh organizmov i poluchennykh iz nih produktov. Metody, osnovannyye na kolichestvennom opredelenii nukleinovykh kislot* (ГОСТ R 53244-2008 Food products. Methods of analysis for detection of genetically modified organisms and products derived from them. Methods based on quantitative determination of nucleic acids), Moscow: Standartinform, 2009, 61 p.
4. ISO 21571:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction.

5. Durbajeva D. M., Kyzdarbekova A. S., Kasymbekova K. B., *Problemy sovremennoj nauki i obrazovaniya*, 2017, No. 6 (88), pp. 76–78. (In Russ.)
6. Kuznecov V. V. *Vestnik DVO RAN*, 2005, No. 3, pp. 40–54. (In Russ.)
7. Aleksandrova E. G., Blinova Yu. A., *Science and education: problems and innovations*, Materials of the III International Scientific and Practical Conference Penza, February 12, 2020, Penza: SamGAU, 2020, pp. 92–94. (In Russ.)
8. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Yu., Semyonov P. A. *PCR v real'nom vremeni* (Real time PCR), 6-e izd, Moscow: Laboratoriya znanij, 2015, 223 p.
9. *Instrukciya po primeneniyu nabora reagentov «PCR-GMO-SOYA-1-FAKTOR» dlya identifikacii GM-soi linij BPS-CV127 09, DP305423, DP356043 v kormah, pishchevoj produkcii, rastitel'nom syr'e i posevnom materiale metodom polimeraznoj cepnoj reakcii (PCR) s fluorescentnoj detekciej v rezhime real'nogo vremeni* (Instructions for use of the reagent kit “PCR-GMO-SOYA-1-FAKTOR” for identification of GM-soybean lines BPS-CV127 09, DP305423, DP356043 in feed, food products, plant raw materials and seed material by real-time polymerase chain reaction (PCR) with fluorescent detection).
10. Shileno A. A., Mitenkova A. E., *Kompleksnye problemy razvitiya nauki, obrazovaniya i ekonomiki regiona*, 2014, No. 1–4, pp. 132–135. (In Russ.)
11. Zorina V. V. *Osnovy polimeraznoj cepnoj reakcii* (Basics of polymerase chain reaction), metodicheskoe posobie, Moscow: DNK-tehnologiya, 2012, 80 p.
12. *GOST 10852–86 Semena maslichnye. Pravila priemki i metody otbora prob* (GOST 10852-86 Oilseeds. Acceptance rules and methods of sampling), Moscow: Standartinform, 1987, 4 p.
13. *GOST 12430–66 Produkciya sel'skohozyajstvennaya. Metody otbora prob pri karantinnom dosmotre i ekspertize* (GOST 12430-66 Agricultural products. Methods of sampling at quarantine inspection and examination), Moscow: Standartinform, 1985, 4 p.
14. *GOST 13979.0–86 ZHmyhi, shroty i gorchichnyj poroshok. Pravila priemki i metody otbora prob* (GOST 13979.0-86 Cakes, meal and mustard powder. Acceptance rules and methods of sampling), Moscow: Standartinform, 1986, 4 p.
15. Tolstova E. A., Ligidova M. M., Agol'cov V. A., *Uchenye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N. E. Baumana*, 2023, Vol. 254, No. 2, pp. 264–272. (In Russ.)
16. *Tekhnologii proizvodstva syrov iz soi / F. YA. Rudik, N. L. Morgunova, N. A. Semilet, SH. A. Pfejfer // Pishchevye tekhnologii budushchego: innovacii v proizvodstve i pererabotke sel'skohozyajstvennoj produkcii* (Food technologies of the future: innovations in the production and processing of agricultural products), Proceedings of articles of the international scientific and practical conference Saratov, March 12-13, 2020, Saratov: Vavilovskij universitet, 2020, pp. 83–85. (In Russ.)
17. Morgunova N. L., Rudik F. Y., Semilet N. A., Lovtsova L. G., Ivanova Z. I., Pfeifer Sh. A., *Technology for reducing urease activity in soybeans*, *IOP Conference Series*, Materials Science and Engineering. Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering Associations, Vol. 862. Krasnoyarsk, 16–18 April, 2020 g., Institute of Physics and IOP Publishing Limited, 2020, P. 62005.
18. Tolstova E. A., Agol'cov V. A., Chernyh O. Yu., Padilo L.P., Popova O.M., *Uchenye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N. E. Baumana*, 2023, Vol. 255, No. 3, pp. 336–343, DOI: 10.31588/2413_4201_1883_2_255_336, EDN: NZACQO. (In Russ.)
19. Ivachenko L. E., Tarasova O. N., Martynenko N. V., Blinova A. A., Lavrent'eva S. I., *Vestnik DVO RAN*, 2022, No. 1 (221), pp. 113–119. (In Russ.)
20. Zinov'ev S. G., Manyunenko S. A., Bindyug D. A., *Zhivotnovodstvo i veterinarnaya medicina*, 2018, No. 4, pp. 12–15. (In Russ.)