

ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДЫ

Л.И. Сапунова, А.А. Костеневич, А.Г. Лобанок, Н.А. Шарейко*, А.В. Жалнеровская*,
Е.А. Долженкова*

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

*Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
Минск, Беларусь, e-mail: sharejko@mail.ru

Введение

Сегодня мировая индустрия комбикормов развивается динамично, однако уже в 2013 г. прогнозируется падение производственных показателей на 3–5% в сравнении с уровнем 2012 г. Поэтому возрастание удельного веса биологически активных кормовых добавок в рационах сельскохозяйственных животных и птицы станет общей тенденцией, которая уже наметилась в Китае, Индии и Бразилии. Там рост производства кормовых добавок в 2011 г. составил 23%, а к 2018 г. достигнет 39%. Прогнозируется, что совокупный среднегодовой темп роста мирового рынка кормовых добавок в период с 2011 по 2018 гг. составит 3,8%, а доход за это время вырастет с 13,5 до 18,5 млрд. долл. США.

При действующем в Европе ограничении на использование в животноводстве и птицеводстве антибиотиков, вызывающих различные побочные эффекты, особая роль в ведении животноводства отводится про- и пребиотикам. Они стимулируют неспецифический иммунитет и тем самым активизируют защитные функции организма животных, снижают их заболеваемость, прежде всего вызванную дисфункциями пищеварительного тракта, сокращают сроки выздоровления, а также улучшают процессы пищеварения и усвоения питательных веществ, повышают аппетит, увеличивают приросты и т.д. [1–3]. Учитывая предполагаемый рост мирового производства кормовых добавок, разработка технологий получения новых продуктов, в том числе комплексного действия, является актуальной задачей, в том числе и для Беларуси.

Ранее нами методом многоступенчатой адаптации к повышающимся концентрациям лактозы селектирован морфологически и биохимически стабильный штамм *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-499-Д [4, 5], на основе которого разработан способ получения внеклеточной β -галактозидазы [6]. Показано, что продуцируемый бактериями фермент *in vivo* катализирует реакцию трансгалактозилирования лактозы (в том числе и в составе молочной сыворотки) с эффективностью образования галактоолигосахаридов, зависящей от концентрации дисахарида в среде культивирования [7–10]. В результате лабораторных исследований выявлена возможность использования ферментативно синтезируемых *in vivo* олигосахаридов в качестве кормовой добавки [11].

Цель настоящей работы – оптимизация условий получения содержащей галактоолигосахариды кормовой добавки и оценка эффективности ее применения в рационах цыплят-бройлеров в полупроизводственных условиях.

Методы исследования

В качестве объекта исследования был использован штамм бактерий *Arthrobacter sulfonivorans* БИМ В-499-Д (далее *A. sulfonivorans*), депонированный в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Культуру бактерий поддерживали на пептонно-дрожжевом агаре, включавшем (в %): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; NaCl – 0,5; агар-агар – 1,0; лактозу – 10,0; pH 7,2–7,4.

Глубинное культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 или 2000 мл с соответственно 50 или 1000 мл питательной среды на качалке (180–200 об/мин) при 27–29°C в течение 48–96 ч.

В состав питательной среды входили (в %): пептон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; K_2HPO_4 – 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; исходный pH – 6,5.

В качестве источника углеводного питания использовали лактозу (5–20%), а также сухое обезжиренное молоко (10,0%), которое являлось единственным ингредиентом питательной среды при наработке лабораторного образца кормовой добавки.

Посевным материалом служили 4–6 об.% водной суспензии клеток бактерий, выращенных при 27–29°C на пептонно-дрожжевом агаре с 1,5% лактозы в течение 72 ч.

В культуральной жидкости и ее бесклеточном фильтрате определяли количество белка [12], активность β -галактозидазы [13], pH – потенциометрически, содержание сухих веществ – рефрактометрически.

Предварительные испытания токсикологических свойств кормовой добавки проводили на белых мышах обоего пола массой тела 19–21 г в соответствии с [14]. Введение добавки мышам опытной группы осуществляли внутрижелудочно с помощью зонда после 12-часовой голодной диеты однократно в дозах 5 000, 10 000, 15 000, 20 000 и 25 000 мг/кг, животным контрольной группы – дистиллированную воду в количестве 25 000 мг/кг. Наблюдение за животными вели в течение 14 сут.

Свойство исследуемых бактерий синтезировать галактоолигосахариды изучали в растущей культуре. Для этого штамм выращивали в содержащих молоко средах в течение 72 ч, после чего бесклеточные фильтраты культуральной жидкости для инактивации фермента выдерживали в течение 5–10 мин на кипящей водяной бане. Охлажденные и разбавленные дистиллированной водой бесклеточные фильтраты наносили на хроматографические пластины в количестве 1,0–1,5 мкл. Разделение маркерных и ферментативно синтезированных сахаридов проводили методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol (Kavalier, Чехия) в системе изопропанол – этилацетат – вода (2:2:1). Продукты разделения проявляли 0,2%-ным раствором β -нафторезорцина в 96%-ном этиловом спирте, содержащем 10 об.% ортофосфорной кислоты, при температуре 110°C в течение 5 мин. Документирование полученных результатов проводили сканированием хроматографических пластин.

Изучение эффективности кормовой добавки проводили в полупроизводственных условиях Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины на цыплятах-бройлерах кросса «Росс-308», из которых по принципу аналогов были сформированы 2 группы по 30 голов в каждой. Птицу содержали напольно на глубокой подстилке в течение 42 сут. Цыплятам опытной группы в основной рацион, состоящий из комбикормов ПК-5 и ПК-6, с водой дополнительно вводили кормовую добавку из расчета 1,5 мл/голову в сут.

Учет живой массы животных проводили путем их группового или индивидуального взвешивания.

Биохимические показатели крови от птицы, стабилизированной 1%-ным раствором гепарина, выполняли на автоматическом анализаторе EUROlyser с использованием диагностических наборов Cormay (Польша) в соответствии с инструкциями производителя.

При проведении микробиологических исследований стерильно отобранное содержимое кишечника птицы массой 1 г последовательно разводили стерильным физиологическим раствором, и 0,1 см³ каждого из разведений высевали в чашки Петри на агаризованные питательные среды [15]. Для селективного выделения бифидобактерий использовали среду «Бифидобактериум», лактобактерий – среду МРС, кишечной палочки и других бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – среду Эндо, микромицетов – агар Сабуро. Посевы для выделения факультативно-анаэробных микроорганизмов инкубировали при 37°C в течение 24–48 ч, строгих анаэробов (бифидо-и лактофлоры) – 72–120 ч в анаэробных условиях в микроанаэроостате; микромицетов – при 25°C в течение 3–10 сут.

Идентификацию микробных культур проводили по общепринятым методикам с учетом морфологических, культуральных и биохимических свойств. Количество микроорганизмов в

кормовой добавке и в содержимом кишечника, а также микробиологические показатели тушек цыплят оценивали согласно действующим ТНПА [16–18].

Приведенные результаты представляют собой статистически обработанные данные 1–2 опытов, выполненных в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Известно, что олигосахариды и, в частности, галактоолигосахариды оказывают пребиотический эффект, способствуя пролиферации бифидо- и лактобактерий, угнетают рост патогенных микроорганизмов, не оказывая отрицательного воздействия на нормальную микрофлору кишечника, стимулируют его перистальтику, содействуют усвоению кальция и магния, проявляют иммуномодулирующее и гипохолестеринемическое действие, снижают риск развития опухолей [2, 3]. Сообщается также о свойстве микробных β -галактозидаз *in vivo* и *in vitro* катализировать реакцию синтеза галактоолигосахаридов, как правило, в средах с высоким (до 60%) содержанием лактозы [19].

Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что с повышением от 5 до 20% содержания лактозы в среде культивирования бактерий *A. sulfonivorans* в первые 48 ч отмечается замедление роста, обусловленное увеличением протяженности лаг-фазы их развития. К 72 ч накопление биомассы культурой во всех вариантах опыта практически выравнивается (11,20–14,40 мг/мл), а к 96 ч достигает наибольшей величины в средах с максимальным содержанием лактозы (20%). В то же время синтез β -галактозидазы находится в обратно пропорциональной зависимости от концентрации лактозы в питательной среде, независимо от длительности культивирования *A. sulfonivorans* (таблица 1).

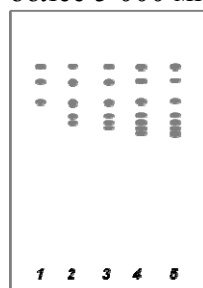
Таблица 1 – Динамика роста *A. sulfonivorans* и синтеза β -галактозидазы в средах с различным содержанием лактозы

Лактоза, %	Длительность культивирования, ч	Биомасса, мг/мл	Белок, мг/мл	β -Галактозидаза:		
				ед/мл	ед/мг биомассы	ед/мг белка
5	48	7,82±0,39	0,12±0,006	3,10±0,16	0,40±0,02	25,83±1,30
	72	14,40±0,70	0,16±0,008	7,74±0,38	0,54±0,03	48,37±2,41
	96	14,90±0,71	0,25±0,011	28,00±1,40	1,88±0,09	112,00±5,62
10	48	7,08±0,35	0,09±0,005	1,05±0,05	0,15±0,01	11,67±0,50
	72	13,40±0,66	0,10±0,005	2,88±0,14	0,21±0,01	28,80±0,88
	96	18,00±0,91	0,25±0,012	10,60±0,51	0,59±0,03	42,40±2,40
15	48	3,98±0,20	0,11±0,005	0,32±0,02	0,08±0,01	2,91±0,14
	72	12,70±0,64	0,13±0,006	1,19±0,06	0,09±0,01	9,15±0,49
	96	18,00±0,90	0,18±0,009	3,80±0,19	0,21±0,01	21,11±1,10
20	48	2,69±0,13	0,09±0,005	0,12±0,01	0,04±0,01	1,33±0,06
	72	11,20±0,55	0,12±0,005	0,77±0,04	0,07±0,01	6,42±0,30
	96	19,40±0,10	0,17±0,008	1,86±0,09	0,10±0,01	10,94±0,53

В бесклеточных фильтратах культуральной жидкости *A. sulfonivorans* обнаруживаются сахараиды с молекулярной массой существенно большей, чем используемые в качестве маркеров глюкоза, галактоза и лактоза (рисунок 1). При этом, с увеличением концентрации лактозы доля высокомолекулярных сахаридов, образующихся *in vivo* с участием внеклеточной β -галактозидазы, а также глюкозы возрастает, тогда как содержание галактозы снижается. Аналогичные результаты получены и при выращивании *A. sulfonivorans* в средах с различным содержанием молока – от 2,5 до 10,0% по содержанию лактозы. Полученные нами данные полностью согласуются с данными литературы об увеличении трансгалактозидазной активности фермента в питательных средах с высоким содержанием β -галактозидов, в частности, лактозы [19].

Путем культивирования *A. sulfonivorans* в среде с 10% сухого молока в качестве единственного источника питания наработан лабораторный образец жидкой кормовой добавки, характеризующейся следующими показателями: pH 6,5; содержание сухих веществ – 11,2%; белок – 7,5 мг/мл; β -галактозидазная активность – 0,95 ед/мл; галактоолигосахариды – присутствуют; КОЕ/мл – $2,5 \times 10^8$. В соответствии с данными

токсикологических испытаний, лабораторный образец кормовой добавки по параметрам острой оральной токсичности отнесен к 4 классу опасности – веществам малоопасным (LD_{50} более 5 000 мг/кг)[20].



1 – смесь глюкозы, галактозы и лактозы (сверху вниз); 2, 3, 4, 5 – бесклеточные фильтраты культуральной жидкости с исходным содержанием лактозы соответственно 5, 10, 15 и 20%

Рисунок 1 – Хроматограмма сахаридов, синтезированных *in vivo* с участием β -галактозидазы *A. sulfonivorans* в средах с различным содержанием лактозы

Результаты проведенных полупроизводственных испытаний показали, что введение в рацион цыплят-бройлеров кормовой добавки, содержащей живые клетки *A. sulfonivorans* и ферментативно синтезированные *in vivo* галактоолигосахариды, повышало среднесуточные приросты живой массы птицы на 11,8% (рисунок 2). Причем наибольший абсолютный прирост приходился на вторую, заключительную стадию откорма птицы – на период с 24 по 42 сут (рисунок 2), а максимум среднесуточных приростов, составляющий 25,4% по сравнению с контролем, – на период с 25 по 32 сут (рисунок 3). При этом наблюдалась активизация белкового, жирового, минерального и витаминного обменов у цыплят опытной группы, нормализовалась работа их печени, что подтверждалось снижением содержания в крови холестерина и билирубина (таблица 2).

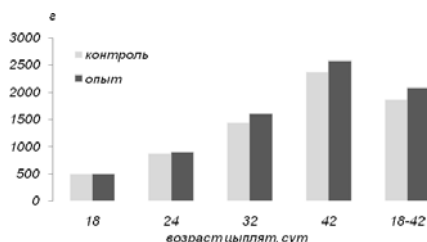


Рисунок 2 – Динамика живой массы цыплят-бройлеров

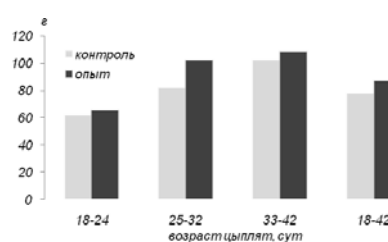


Рисунок 3 – Среднесуточные приросты живой массы (г) цыплят-бройлеров

Таблица 2 – Биохимические показатели крови цыплят-бройлеров

Показатель крови	Возраст птицы			
	33 сут		42 сут	
	в группах:			
	контрольная	опытная	контрольная	опытная
Общий белок, г/л	22,16±0,52	26,56±0,75	12,61±0,23	13,84±0,37
Альбумины, г/л	10,31±0,81	12,22±1,1	12,61±0,23	13,84±0,37
Глобулины, г/л	11,85±1,06	14,34±0,72	14,98±0,7	16,03±0,51
Глюкоза, ммоль/л	13,8±0,64	11,79±0,34	9,73±0,48	8,58±1,86
Триглицериды, ммоль/л	0,598±0,10	0,88±0,03	0,943±0,05	1,56±0,32
Мочевая кислота, мкмоль/л	342,96±21,76	336,8±16,32	367,28±25,13	332,10±13,39
Холестерин, ммоль/л	4,3±0,35	6,426±0,17	2,5±0,34	2,03±0,11
Билирубин, мкмоль/л	16,6±0,58	7,86±1,68	5,89±0,2	2,19±0,24
Аланинаминотрансфераза, ЕД/л	76,32±22,48	26,39±3,79	19,44±0,51	13,94±0,29
Аспартатаминотрансфераза, ЕД/л	39,58±41,07	34,16±9,83	38,75±1,86	32,73±5,82
Витамин А, мкг/л	0,421±0,03	0,585±0,04	0,655±0,06	0,668±0,09
Витамин Е, мкг/л	4,13±0,19	4,34±0,1	5,36±0,03	5,48±0,27
Витамин В1, мкг/мл	2,394±0,2	3,08±0,27	2,99±0,26	3,31±0,22
Кальций, ммоль/л	2,628±0,12	2,58±0,16	2,68±0,18	2,33±0,13
Фосфор, ммоль/л	5,686±0,75	2,298±0,18	1,17±0,09	2,0±0,05
Магний, ммоль/л	0,938±0,06	0,896±0,02	0,998±0,06	1,135±0,02
Железо, мкмоль/л	47,27±2,77	30,43±2,6	25,62±2,69	23,27±1,17
Марганец, мкг/л	31,86±2,85	52,26±5,68	57,35±8,42	62,0±4,97
Кобальт, мкг/л	26,04±1,6	33,22±4,14	20,9±1,25	21,13±0,91
Медь, мкг/л	547,92±38,88	572,32±33,26	573,18±16,48	574,45±17,02
Цинк, мг/л	5,01±0,37	6,578±0,24	6,06±0,39	6,37±0,21

Установлено также, что применяемая в рационах цыплят-бройлеров кормовая добавка стимулировала размножение бифидофлоры кишечника, количество которой по окончании эксперимента превышало контрольный показатель на порядок, практически полностью угнетала развитие бактерий группы кишечной палочки, плесневых грибов и грибов рода *Candida* (таблица 3). В то же время у птицы контрольной группы соотношение облигатной, факультативной и транзитной микрофлоры кишечника приблизилось к характерному для дисбактериоза показателю.

Таблица 3 – Влияние кормовой добавки на микрофлору кишечника цыплят-бройлеров

Группы цыплят-бройлеров	Представители кишечной микрофлоры, КОЕ/г:			
	бифидобактерии	лактобактерии	кишечная палочка	микробицеты (р. <i>Candida</i>)
Контрольная	$(1,6 \pm 0,6) \times 10^{10}$	$(6,3 \pm 1,1) \times 10^8$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^8$	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^4$
Опытная	$(8,9 \pm 0,6) \times 10^{11}$	$(4,6 \pm 0,8) \times 10^{10}$	$(7,8 \pm 1,0) \times 10^7$	не выделены

У цыплят контрольной группы в кишечном бактериоценозе преобладала бифидо- и лактофлора. В то же время отмечено высокое содержание факультативных представителей бактерий группы кишечной палочки – до $1,3 \times 10^8$ КОЕ/г, лишь незначительно уступавшей количеству лактобактерий. Введение в рацион цыплят-бройлеров кормовой добавки повышало по сравнению с контрольной группой птицы количество бифидофлоры до $8,9 \times 10^{11}$ КОЕ/г, а также количества лактобактерий на два порядка. Установившееся при этом соотношение облигатной (бифидо- и лактобактерии) и факультативной кишечной микрофлоры (эшерихии) в опытной группе цыплят также было оптимальным.

Установлено, что у цыплят контрольной группы микробиологические показатели мяса и потрохов хотя и соответствовали гигиеническим требованиям, предъявляемым к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов, однако были на порядок выше, чем у птицы опытной группы (таблица 4).

Таблица 4 – Микробиологические показатели мяса и потрохов цыплят-бройлеров

Группы цыплят-бройлеров	Микробиологические показатели:			
	охлажденного мяса птицы		охлажденных потрохов птицы	
	КМАФАнМ, КОЕ/г	патогенные микроорганизмы, в т.ч. <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> , КОЕ/25 г	КМАФАнМ, КОЕ/г	патогенные микроорганизмы, в т.ч. <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> , КОЕ/25 г
Контрольная	$(2,6 \pm 1,6) \times 10^5$	не обнаружены	$(2,2 \pm 0,7) \times 10^4$	не обнаружены
Опытная	$(3,9 \pm 0,4) \times 10^2$	не обнаружены	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^3$	не обнаружены

Выводы

В результате выполненных исследований обоснована возможность синтеза *in vivo* галактоолигосахаридов с участием β -галактозидазы бактерий *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д, культивируемых в средах с молоком в качестве единственного источника питания и энергии. Нароботан лабораторный образец жидкой кормовой добавки, содержащей живые клетки штамма-продуцента и синтезированные ферментативным путем галактоолигосахариды. Показано, что использование в рационах цыплят-бройлеров кормовой добавки приводит по сравнению с контролем к увеличению живой массы, активизации белкового, жирового, минерального и витаминного обмена организма птицы, нормализации работы печени. При этом повышается содержание в составе кишечной микрофлоры цыплят-бройлеров бифидо- и лактобактерий и снижается количество представителей группы кишечной палочки и микробицетов, нормализуется бактериоценоз кишечника, улучшаются микробиологические показатели мяса и потрохов птицы.

Таким образом, полученные результаты указывают на перспективность использования штамма бактерий *A. sulfonivorans* БИМ В-499-Д – продуцента внеклеточной β -галактозидазы в биотехнологиях получения галактоолигосахаридов и содержащей их кормовой добавки пребиотического действия.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследований сотрудникам кафедр фармакологии, микробиологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Витебской государственной ордена «Знак Почета» академии ветеринарной медицины.

Список литературы

1. O'Flaherty, S. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host / S. O'Flaherty, T.R. Klaenhammer // Int. Dairy J. – 2010. – Vol. 20, № 4. – P. 262–268.
2. Park, A.R. Galacto-oligosaccharide production using microbial β -galactosidase: current state and perspectives / A.R. Park, D.-K. Oh // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 85, № 5. – P. 1279 – 1286.
3. Galactooligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics / D.P.M. Torres[et al.] // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2010. – Vol. 9. – P. 438–452.
4. Костеневич, А.А. Характеристика морфологических вариантов *Arthrobacterspecies*, полученных на агаризованной среде с высоким содержанием лактозы / А.А. Костеневич, Л.И. Сапунова // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Матер. Всерос. симп. с междунар. участием. М., МГУ, 27–29 января 2011 г. / Отв. ред. Нетрусов А.И., Колотилова Н.Н. – М.: МАКС Пресс, 2011. – С. 69.
5. Синтез бета-галактозидазы морфологическими вариантами *Arthrobacterspecies*/ А.Н. Черная [и др.] // Биологически активные вещества микроорганизмов: прошлое, настоящее, будущее: Матер. Всерос. симп. с междунар. участием. М., МГУ, 27–29 января 2011 г. / Отв. ред. Нетрусов А.И., Колотилова Н.Н. – М.: МАКС Пресс, 2011. – С. 129.
6. Способ получения внеклеточной β -галактозидазы : Пат. 15050 Респ. Беларусь, МПК7 С 12N 9/38, С 12N 1/20, С 12R 1/06 / Л.И. Сапунова, И.О. Тамкович, А.Г. Лобанок, А.А. Костеневич ; заявитель ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси». – № а 20091062; заявл. 14.07.2009; опубл. 28.02.2011 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 5. – С. 130–131.
7. Сравнительная характеристика синтеза бета-галактозидазы бактериями рода *Arthrobacter* на средах с различным содержанием лактозы / Л.И. Сапунова [и др.] // Probleme actualele microbiologiei i biotehnologiei: Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de 50 aniversări de la fondarea Secției de Microbiologie, Chișinău, 5–6 oct. 2009 / com. șt. intern. Duca Gheorghe (preș.), Furdul Teodor, Zveaghintev D.G. [et al.]; com. org. Rudic Valeriu, Cepoi Liliana, Usatâi Agafia [et al.]. – Ch.: S.n., 2009 (Tipogr. «Elena-V.I.» SRL). – P. 127.
8. Оценка бета-галактозидазной активности бактерий рода *Arthrobacter*, растущих в средах с молочной сывороткой / А.А. Костеневич [и др.] // Первый шаг в науку – 2010: Сб. матер. Междунар. форума учащейся и студенческой молодежи, Минск, 3–6 мая 2010 г. – Минск: Четыре Четверти, 2010. – С. 395–398.
9. Черная, А.Н. Сравнение гидролазной и трансгликозидазной активностей бета-галактозидаз бактерий рода *Arthrobacter*/ А.Н. Черная, Л.И. Сапунова // Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии: Тез. докл. и стеногр. сообщ. XXIII зимней молодежной научной школы, Москва, 7–10 февраля 2011 г. – М.: ИБХ РАН, 2011. – С. 171.
10. Enzymatic synthesis of galactooligosaccharides – growth promoters of beneficial intestinal microflora in humans and animals / L.I. Sapunova [et al.] // Abstracts of XXXII Int. Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease (SOMED), October 29–30, 2009, St. Petersburg, Russia. – Гастроэнтерология С.-Петербурга. – 2009. – № 4. – С. A22–A23.
11. Изучение возможности использования галактоолигосахаридов, синтезируемых *in vivo* бактериями *Arthrobacter sulfonivorans*, в кормлении цыплят-бройлеров/ А.А. Костеневич [и др.] // Зоотехнічна наука: історія, проблеми, перспективи: матеріали. III міжнародної науково-практичної конференції, 22–24 травня 2013/ Подільський державний аграрно-технічний університет; за ред. професора М.Г. Повознікова. – Кам'янець-Подільський: видавець ПП Зволейко М.Г., 2013. – С. 57–58.
12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Ann. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
13. Kuby, S.A. Purification and kinetics of β -galactosidase from *E.coli*, strain K-12 / S.A. Kuby, H.A. Lardy // J. Amer. Chem. Soc. – 1953. – Vol. 75, № 4. – P. 890–896.
14. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / Мин-во сельск.хоз-ва и продовольствия РБ, НАН Беларуси, РУП «Ин-т эксперимент. ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»; сост. А.Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 153 с.
15. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям: ГОСТ 7702.2.0–95. – Введ. 01.01.99. – Минск: ГК по стандартизации РБ: Белор. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 1999. – 20 с.
16. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований: СТБ ISO 7218–2010. – Введ. 01.01.2011. – Минск: ГК по стандартизации РБ: Бел. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2010. – 66 с.
17. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Метод выявления сальмонелл: ГОСТ 7702.2.3–93. – Введ. 01.01.96. – Минск: ГК по стандартизации РБ: Белор. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 1996. – 8 с.
18. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты птичьих. Метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов: ГОСТ 7702.2.1–95. – Введ. 01.01.1999. – Минск: ГК по стандартизации РБ: Белор. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 1999. – 8 с.
19. Husain Q. β -Galactosidase and their potential applications: a review/ Q. Husain // Crit. Rev. Biotechnol. – 2010. – Vol. 30, № 1. – P. 41–62.
20. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007–76. – Введ. 01.01.1977. – Минск: ГК по стандартизации РБ: Белор. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 1977. – 8 с.