



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2519–268X print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8526
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 602.4:[577.15:577.114.4]:635.342

Obtaining and characteristic of degradation products of *Lactobacillus acidophilus* K 3111 peptidoglycan

A.I. Kapustian, N.K. Chernob

Odesa National Academy of Food Technologies, Odesa, Ukraine

Article info

Received 19.02.2018

Received in revised form

12.03.2018

Accepted 16.03.2018

Odesa National Academy of Food
Technologies, Kanatna Str., 112,
Odesa, 65039, Ukraine.
Tel. +38-096-758-88-34
E-mail: fst.journal@ukr.net

Kapustian, A.I., & Chernob, N.K. (2018). Obtaining and characteristic of degradation products of *Lactobacillus acidophilus* K 3111 peptidoglycan. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(85), 141–147. doi: 10.15421/nvlvet8526

It is shown in the article that low molecular weight degradation products of peptidoglycans of bacterial walls possess high immunotropic activity and can stimulate evolutionarily fixed mechanisms of immune response. It is proposed to obtain low molecular weight fragments of peptidoglycans of cell walls of *Lactobacillus acidophilus* K 3111 – muropeptides. Fragmentation was carried out by combining physical and enzymatic methods of disintegration. As a physical factor of influence, an ultrasonic treatment was used, as enzymatic factor, a treatment with proteases of digestive, plant and microbial origin was used. These enzymes have a significant range of substrate specificity and can catalyze the specific binding of peptidoglycans to bacterial walls. The regularities of ultrasonic disintegration of *Lactobacillus acidophilus* K 3111 has been investigated in the article. The rational conditions of ultrasonic disintegration are the treatment of biomass at a frequency of 35 kHz for 600 seconds. Under these conditions, the maximum amount of amino acids is accumulated in the disintegrate and the integrity of most bacterial cells is violated. The regularities of the enzymolysis of peptidoglycans of cell walls of *Lactobacillus acidophilus* K 3111 by pancreatin, papain and protosubtilin has been determined. It has been shown that ultrasonic disintegration, which precedes enzymatic hydrolysis, contributes to a significant increase in the content of low molecular weight peptides in hydrolysates by almost 50%. The expediency of using an enzyme of plant origin papain for enzymatic fragmentation of peptidoglycan is substantiated. When the ratio of the enzyme (papain): substrate 1: 200 and the duration of the process for 180 minutes, the highest content of low molecular weight peptides in hydrolysates (6.6 mg/cm³) is achieved. It is proved that the target compounds muropeptides are contained in the products of enzymatic hydrolysis, the content of muropeptides reaches 38% of the total amount of low molecular weight peptides at the hydrolysis by papain, 31% – by pancreatin and 23% – by protosubtilin.

Key words: peptidoglycan, muropeptides, disintegration, ultrasonic, enzymatic hydrolysis.

Отримання та характеристика продуктів деструкції пептидоглікану *Lactobacillus acidophilus* K 3111

A.I. Капустян, Н.К. Черно

Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса, Україна

Показано, що низькомолекулярні продукти деструкції пептидогліканів бактеріальних стінок володіють високою імунотропною активністю та здатні стимулювати еволюційно закріплені механізми імунної відповіді. Запропоновано отримання низькомолекулярних фрагментів пептидогліканів клітинних стінок *Lactobacillus acidophilus* K 3111 – муропептидів. Фрагментацію здійснювали комбінуванням фізичних та ензиматичних методів дезінтеграції. У якості фізичного фактору впливу застосовували ультразвукову обробку, ензиматичного – обробку протеазами травного, рослинного та мікробіального походження. Дані ферменти володіють значним ареалом субстратної специфічності та здатні каталізувати специфічні зв'язки пептидогліканів бактеріальних стінок. Досліджено закономірності ультразвукової дезінтеграції *Lactobacillus acidophilus* K 3111. Встановлено, що раціональними умовами ультразвукової дезінтеграції є обробка біомаси за частоти 35 кГц протягом 600 с. За цих умов у дезінтеграті накопичується максимальна кількість амінокислот та порушується цілісність більшості бактеріальних клітин. Визначено закономірності ферментолізу пептидогліканів клітинних стінок *Lactobacillus acidophilus* K 3111 панкреатином, папаїном та протосубтиліном. Показано, що ультразвукова дезінтеграція, яка передує ферментативному гідролізу, сприяє суттєвому, майже на 50%, зростан-

ню вмісту низькомолекулярних пептидів у ферментолізатах. Обґрунтовано доцільність використання ферменту рослинного походження папаїну для ензиматичної фрагментації пептидоглікану. При співвідношенні фермент (папаїн): субстрат 1:200 та тривалості процесу протягом 180 хв, досягається найбільший вміст низькомолекулярних пептидів у ферментолізатах (6,6 мг/см³). Доведено, що у складі продуктів ферментолізу містяться цільові сполуки – мурапептиди, вміст яких сягає 38% від загальної кількості низькомолекулярних пептидів при ферментолізі папаїном, 31% – панкреатином та 23% – протосубітиліном.

Ключові слова: пептидоглікан, мурапептиди, дезінтеграція, ультразвук, ферментативний гідроліз.

Вступ

Загальновідомою проблемою сучасності є збільшення випадків застудних та інфекційних захворювань серед населення. Стан здоров'я населення багатьох країн світу значно пригнічується під впливом антропогенних та соціальних факторів. Створення та впровадження ефективних превентивних заходів є необхідним для подолання цієї глобальної проблеми. Важливою є нутритивна підтримка населення, а саме, введення в раціон функціональної їжі з вмістом функціонально-фізіологічних імунотропних інгредієнтів, здатних сприяти підвищенню опірності організму до різноманітних захворювань.

Перспективним та доцільним є використання у якості імунотропних харчових інгредієнтів продуктів деградації пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних бактерій – низькомолекулярних мурапептидів (Kapustyan and Cherny, 2015; Cherny and Kapustyan, 2016). Фрагменти пептидоглікану здатні проникати через кишечний бар'єр (Vavricka, 2004), стимулюючи еволюційно закріплені механізми імунної відповіді. Розщеплений пептидоглікан транспортується всередину клітин і розпізнається цитоплазматичними рецепторами (Nod 1 і Nod 2). Після активації ці молекули викликають внутрішньоклітинні сигнали, які приводять до активації транскрипційних відповідей, кульмінацією яких є експресія запальних генів (Traub et al., 2006; Kawai and Akira, 2010; Qingshan et al., 2012; Matsui et al., 2014). Структури пептидоглікану, що розпізнаються рецепторами Nod 1 та Nod 2 зображено на рис 1.

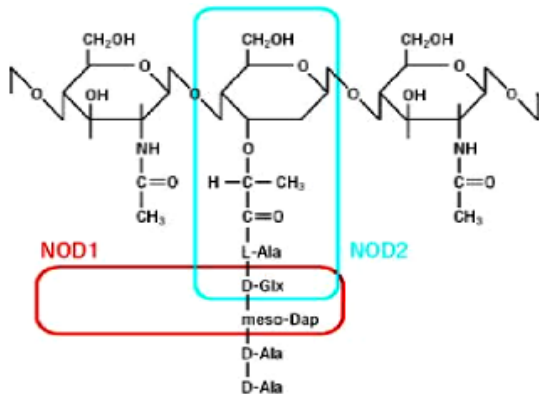


Рис. 1. Структури що розпізнаються рецепторами Nod 1 та Nod 2 (Kawai and Akira, 2010)

Досить складним є питання деструкції бактерій, особливо грампозитивних. Клітинні стінки мікроорганізмів надзвичайно стійкі до дії деградуючих факторів. Роль основного захисного бар'єру виконує пептидоглікан, доля якого й визначає міцність бактеріальних клітин (Chapot-Chartier and Kulakauskas,

2014). Тому актуальним є розроблення доступних та простих у реалізації способів деструкції пептидогліканів клітинних стінок пробіотичних культур з метою отримання їхніх біологічно активних фрагментів.

Деструкцію клітинних стінок мікроорганізмів здійснюють застосовуючи фізичні, хімічні, біохімічні або комбіновані методи впливу. Більшість відомих методів отримання мурапептидів (Senchenko et al., 2005; Gavrilin et al., 2007; Matsumoto et al., 2009; Regulski, 2012; Ku'hner et al., 2014) досить складні у виконанні, особливо у промислових масштабах. Вони є багатостадійними, із застосуванням специфічних та високовартісних реагентів. Як правило, для отримання структурних компонентів пептидогліканів регулярної будови, застосовують комбінацію фізичних та ензиматичних методів впливу (Matsumoto et al., 2009; Regulski, 2012; Ku'hner et al., 2014), причому із фізичних методів дезінтеграції бактеріальних клітин використовують переважно ультразвукову обробку (Livinskaya et al., 2011). Для ензиматичного каталізу специфічних зв'язків пептидоглікану (рис. 2), як правило, використовують протеази, мурамідази, або їхню комбінацію (Senchenko et al., 2005; Gavrilin et al., 2007; Matsumoto et al., 2009; Regulski, 2012; Ku'hner et al., 2014). У якості протеаз найчастіше застосовують травні ферменти: пепсин, трипсин, хімотрипсин або комплексний ферментний препарат панкреатин. У якості мурамідаз застосовують лізоцим, або мутанолізін, який є метаболітом *Streptomyces globisporus* ATCC 21553.

Враховуючи складність структури пептидогліканів (рис. 2), доцільним є використання для їхньої часткової деструкції більш широкого спектру протеаз із залученням, окрім травних, рослинних і мікробних протеолітичних ферментів, що володіють більш значним ареалом субстратної специфічності (Yakubke and Eshkide, 1985; Golovach et al., 2008; Ovsyannikova and Komarova, 2012; Geiger et al., 2017).

У представлений роботі розглянуто можливість отримання імунотропних фрагментів пептидогліканів клітинних стінок лактобацил, шляхом застосування процесів ультразвукової обробки та ферментолізу протеазами не тільки травного, а й рослинного та мікробіального походження. Комбінування вказаних методів дезінтеграції мікробних клітин може сприяти більш глибокому гідролізу пептидогліканів їхніх клітинних стінок, що дозволить збільшити вихід цільових імунотропних мурапептидів. Окрім того, багатостадійний процес очищення цільових компонентів запропоновано здійснювати шляхом застосування іонообмінної хроматографії, що дозволить значно скоротити стадійність та тривалість загального процесу отримання імунотропних мурапептидів.

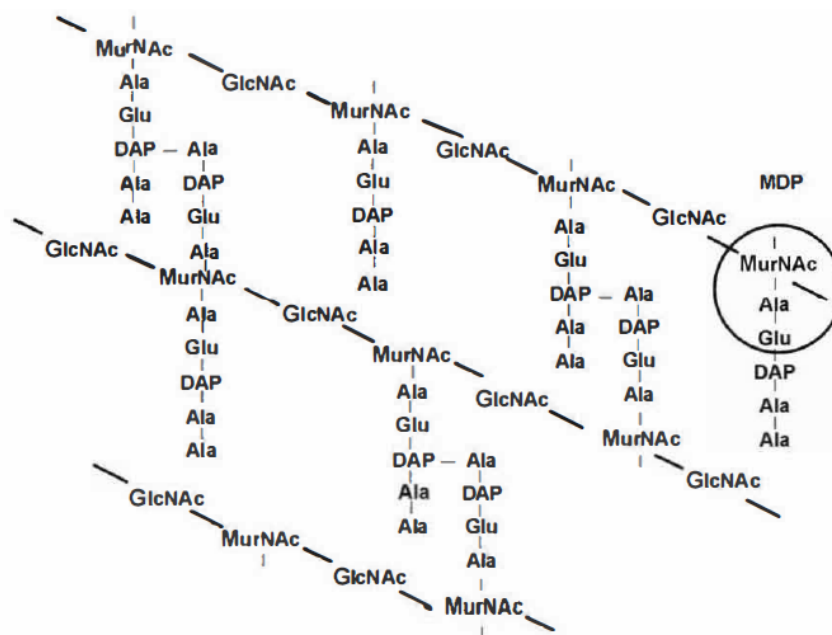


Рис. 2. Структурна організація пептидоглікану бактеріальних стінок

Мета роботи – отримання та характеристики низькомолекулярних фрагментів пептидогліканів *Lactobacillus acidophilus* K 3111 – муропептидів, шляхом дезінтеграції із залученням ультразвукової обробки та ферментолізу протеазами травного, рослинного та мікробіального походження.

Завдання досліджень:

1. дослідити закономірності ультразвукової дезінтеграції *Lactobacillus acidophilus* K 3111;
2. дослідити закономірності ферментолізу пептидогліканів клітинних стінок *Lactobacillus acidophilus* K 3111 панкреатином, папаїном та протосубтиліном;
3. надати характеристику отриманих низькомолекулярних продуктів деструкції пептидогліканів.

Матеріал та методи досліджень

Для досліджень використовували біомасу (БМ) *Lactobacillus acidophilus* K 3111 із колекції НВП «Аріадна», м. Одеса із концентрацією $7 \cdot 10^9$ КУО/см³. Виділення клітин з культуральної рідини здійснювали шляхом центрифугування протягом 15 хв при 8000 хв^{-1} . Осад клітин відмивали дистильованою водою та ресуспендували. Для ультразвукової дезінтеграції використовували суспензію клітин *Lactobacillus acidophilus* K 3111 у дистильованій воді з вмістом сухих речовин $4,78 \pm 0,02\%$. Джерело ультразвуку – ультразвукові ванни ПСБ-1335-05 із робочою частотою 25, 35 та 40 кГц, тривалість обробки варіювали в інтервалі 60–900 с.

Ферментативну деструкцію клітинних стінок біомаси здійснювали обробкою панкреатином із протеолітичною активністю 370 Од/г, протосубтиліном Г20х із активністю 70 Од/г, папаїном із активністю 10 Од/мг. Постійними параметрами гідролізу були температура $37 \text{ }^\circ\text{C}$ та $\text{pH} = 7,4$. Варіювали співвідношення фермент: субстрат (вміст сухих речовин БМ) у

діапазоні від 1 : 50 до 1 : 300 та тривалість інкубації реакційної суміші – 10–300 хв. Ферментоліз зупиняли екстремним нагріванням до температури $100 \text{ }^\circ\text{C}$, суміш охолоджували, відокремлювали рідку фазу від твердої шляхом центрифугування протягом 10 хв при 8000 хв^{-1} .

У рідкій фазі контролювали вміст вільних амінокислот методом формольного титрування (Semak et al., 2007). Вміст низькомолекулярних пептидів (НМП) визначали методом Бенедикта (Semak et al., 2007) після осадження високомолекулярних білків 10% розчином трихлороцтової кислоти (ТХО), (адже відомо, що пептиди з молекулярною масою до 1500 Да не осаджуються розчинами ТХО) та наступної іонообмінної хроматографії з використанням катіоніту КУ-2 з метою позбавлення від нейтральних цукрів, органічних кислот, продуктів метаболізму. Вміст муропептидів у складі НМП визначали Антроновим методом (Morris, 1948).

Паралельно визначали відповідні параметри для контрольних зразків – ферментолізатів *Lactobacillus acidophilus* K 3111, які не піддавали попередній ультразвуковій обробці.

Результати та їх обговорення

Пробіотичні бактерії належать до грамположитивних мікроорганізмів, доля пептидоглікану в яких сягає 70% від їхньої загальної маси, що робить їх надзвичайно стійкими до впливу деградуючих факторів. Тому для порушення анатомічної цілісності клітинних оболонок *Lactobacillus acidophilus* K 3111 здійснено серію дослідів із застосуванням ультразвуку, який є найбільш ефективним фізичним способом первинної деструкції мікроорганізмів (Livinskaya et al., 2011). Одним із найбільш простих та доступних методів детекції ступеня дезінтеграції мікробних клітин є визначення динаміки накопичення вільних амі-

нокислот у складі дезінтеграту (Shaphaev et al., 2015). На рис. 3 зображено залежність накопичення останніх від умов ультразвукової обробки.

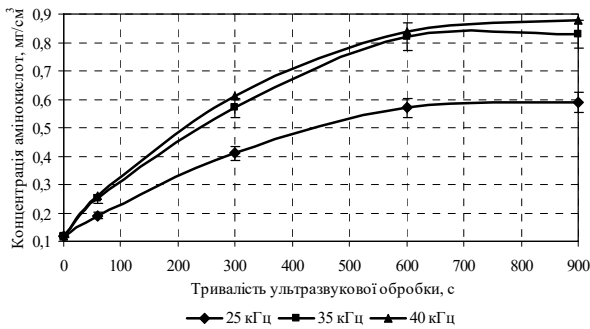


Рис. 3. Залежність накопичення амінокислот у дезінтегратах *Lactobacillus acidophilus* K 3111 від частоти та тривалості ультразвукової обробки

Виходячи з даних, наведених на рис. 3, за зростанням накопичення амінокислот у дезінтегратах, можна констатувати, що дезінтегруючий вплив ультразвуку на бактеріальні клітини має місце при всіх варіаціях частоти ультразвуку. Збільшення вмісту амінокислот у дезінтегратах при обробці ультразвуком в інтервалі часу 60–600 с носить лінійний характер. Із подальшим збільшенням тривалості ультразвукової обробки, вміст амінокислот у дезінтегратах збільшується несуттєво. Найбільш вагомий дезінтегруючий вплив ультразвуку на клітинні оболонки *Lactobacillus acidophilus* K 3111 має місце за обробки частотою

40 кГц протягом 900 с, при цьому у дезінтегратах накопичується максимальна кількість амінокислот. Накопичення вільних амінокислот у реакційному середовищі за обробки частотою 35 кГц протягом 900 с всього на 5%, а протягом 600 с – на 7% менше, ніж при обробці ультразвуком за частоти 40 кГц протягом 900 с. Отже, раціональною є обробка суспензії *Lactobacillus acidophilus* K 3111 ультразвуком за частоти 35 кГц протягом 600 с.

Для подальшої деструкції пептидогліканів клітинних стінок лактобацил, із метою отримання їхніх низькомолекулярних фрагментів муропептидів, здійснювали їхній ферментативний гідроліз. Паралельно проводили ферментоліз пептидогліканів зразків, які не піддавали ультразвуковій обробці. Для досягнення максимальної глибини гідролізу пептидоглікану, застосовували серію протеаз із широким ареалом субстратної специфічності. У якості травних протеаз використовували панкреатин, у якості протеаз мікробіального походження – протосубтилін, рослинного походження – папаїн. У ферментолізатах контролювали накопичення кількості НМП з молекулярною масою до 1500 Да, адже відомо, що саме такі пептиди володіють високою імунотропною активністю (Traub et al., 2006; Cherno and Kapustyan, 2016). На рис. 4 представлено залежність накопичення НМП від виду протеази, тривалості ферментолізу та типу субстрату (нативні клітини *Lactobacillus acidophilus* K 3111 та пептидогліканів після ультразвукової обробки бактерій.

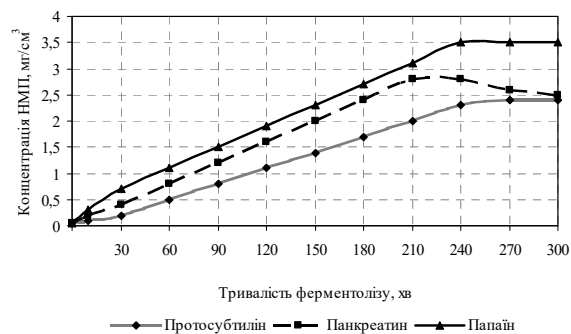
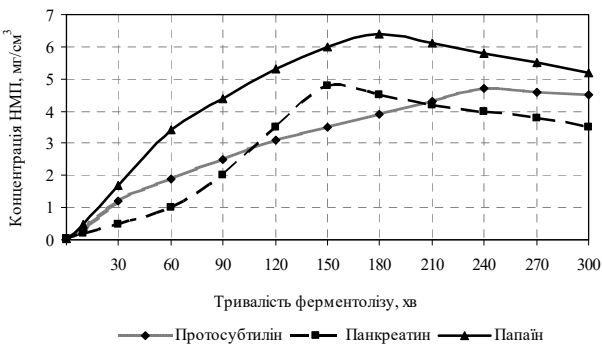


Рис.4. Залежність накопичення НМП у ферментолізатах *Lactobacillus acidophilus* K 3111 від виду протеази та тривалості ферментолізу (при співвідношенні фермент:субстрат 1:100):
 а) ферментоліз ультразвукового дезінтеграту *Lactobacillus acidophilus* K 3111;
 б) ферментоліз *Lactobacillus acidophilus* K 3111 без попередньої ультразвукової обробки

Аналізуючи дані рис. 4 можна зробити висновок, що ефективність ферментолізу різними видами протеаз протеогліканів клітинних стінок бактерій, що були піддані ультразвуковій обробці, в аспекті накопичення НМП є беззаперечною, порівняно з ферментолізом протеогліканів нативних клітин *Lactobacillus acidophilus* K 3111. Так, накопичення НМП у реакційному середовищі при ферментолізі протеогліканів бактерій підданих ультразвуковій обробці папаїном \approx на 55% більше, ніж при ферментолізі таких нативних клітин цим же ферментом, панкреатином – \approx на 46% більше, протосубтиліном – \approx на 52% більше. При порівнянні кількості НМП у ферментолізатах ультра-

звукових дезінтегратів різними протеазами можна зробити висновок, що найбільш ефективним є застосування папаїну, оскільки при цьому накопичується найбільша кількість – 6,4 мг/см³ НМП у реакційному середовищі, що на 25% більше, ніж за обробки панкреатином, та на 27% більше, ніж за обробки протосубтиліном.

Такий характер ферментолізу різними протеазами можна пояснити характером їхньої субстратної специфічності. Так, папаїн може гідролізувати пептидні зв'язки пептидоглікану клітинних стінок бактерій, що утворені лізином та гліцином, які домінують у структурі пептидоглікану (рис. 2). Щодо панкреатину, до

складу якого входять протеази трипсин та хімотрипсин, та субтиліну – їхня субстратна специфічність дещо вища, ніж у папаїну, тому і ймовірність гідролізу специфічних зв'язків у складі пептидоглікану менша, що й підтверджується результатами досліджень.

На наступному етапі досліджень визначали залежність накопичення НМП у ферментолізатах *Lactobacillus acidophilus* К 3111 від вмісту ферменту у реакційному середовищі (тривалість інкубації складала 180 хв) (рис. 5).

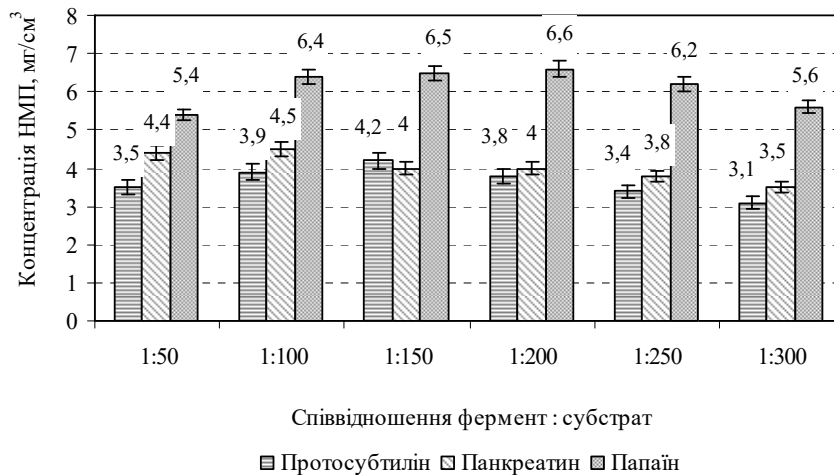


Рис. 5. Залежність накопичення НМП у ферментолізатах *Lactobacillus acidophilus* К 3111 від типу ферменту та співвідношення фермент : субстрат (тривалість ферментолізу 180 хв)

Результати експериментів свідчать про те, що найбільший вміст НМП у середовищах ферментолізатів різних протеаз досягається із застосуванням неоднакових концентрацій ферментів у реакційних сумішах. Так, найбільший вміст НМП у ферментолізаті, отриманому з використанням папаїну має місце при співвідношенні фермент : субстрат 1 : 200 та складає 6,6 мг/см³; із використанням панкреатину – при співвідношенні фермент : субстрат 1 : 100 та складає 4,5 мг/см³; із використанням протосубтиліну – при співвідношенні фермент : субстрат 1 : 150 та складає 4,2 мг/см³. При цьому тенденція у превалюванні вміс-

ту НМП у ферментолізатах, отриманих із використанням папаїну зберігається.

Із метою наочної демонстрації ефективності запропонованих методів дезінтеграції лактобацил, залучено методи мікроскопії. На рис. 6 зображено мікрофотографії мікробних клітин до та після ультразвукової обробки за частоти 35 кГц протягом 600 с, а також після ферментолізу протеоглікана бактерій, що піддавали ультразвуковій обробці, папаїном при співвідношенні фермент : субстрат 1 : 200 та тривалості процесу 180 хв.

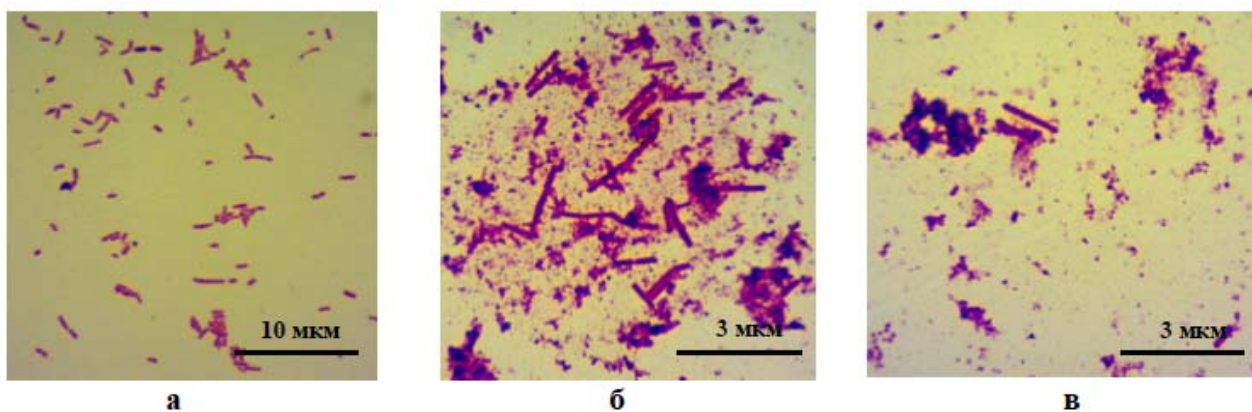


Рис. 6. Мікрофотографії *Lactobacillus acidophilus* К 3111:

а) нативні клітини; б) після обробки ультразвуком протягом 600 с за частоти 35 кГц; в) після ферментолізу ультразвукового дезінтеграту папаїном при співвідношенні фермент:субстрат 1 : 100 та тривалості 180 хв

Мікрофотографії на рис. 6 дозволяють констатувати ефективність обраних методів та режимів деструкції. На рис. 6а представлено контрольний зразок – нативні клітини *Lactobacillus acidophilus* К 3111, які мають чіткий контур та строго визначену форму. Стан біомаси на рис. 6 б вже різко відрізняється від

контрольного зразка, порушено цілісність основної маси бактеріальних клітин. Отже, застосування ультразвукової дезінтеграції створило передумови для більш ефективного ферментативного гідролізу пептидогліканів клітинних стінок, оскільки зовнішня захисна оболонка бактерій є значною перешкодою для кон-

такту активних центрів ферментів зі *специфічним* субстратом, що підтверджується результатами досліджень, наведеними на рис. 4 а,б. Після ферментолізу (рис. бв) залишаються одиниці не пошкоджених зовні клітин, але й не здатних до колонієутворення.

Після проведення серії дослідів, в яких проводили детекцію НМП у складі дезінтегратів бактеріальних клітин, доцільним було проведення досліджень щодо ідентифікації муропептидів у їх складі. Наявність сполук муропептидного ряду визначали за реакцією з Антроновим реагентом, яка базується на тому, що вуглеводна частина муропептидів (мурамова кислота та N-ацетилглюкозамін) за допомогою концентрованої сульфатної кислоти перетворюється на фурфурол або його похідні, які шляхом конденсації з реагентом Антрона утворюють сполуки зеленого кольору. Ці маніпуляції виконували зі зразками, які раніше піддавали іонообмінній хроматографії, з метою позбавлення від нейтральних вуглеводів, які можуть перешкоджати чистоті експерименту.

Таким чином встановлено, що у складі ферментолізату, отриманому з використанням папаїну при співвідношенні фермент : субстрат 1:200 вміст муропептидів складає 38% від загального вмісту НМП, із використанням панкреатину при співвідношенні фермент : субстрат 1:100 – 31%; із використанням протосубтиліну при співвідношенні фермент : субстрат 1:150 – 23%.

Висновки

Досліджено закономірності ультразвукової дезінтеграції *Lactobacillus acidophilus* K 311. Встановлено, що раціональними умовами обробки біомаси є: частота 35 кГц, термін експозиції 600 с. Визначено закономірності ферментолізу пептидогліканів клітинних стінок *Lactobacillus acidophilus* K 3111 панкреатином, папаїном та протосубтиліном. Показано, що ультразвукова дезінтеграція, яка передуює ферментативному гідролізу, сприяє суттєвому, майже на 50%, зростанню вмісту НМП у ферментолізатах. Обґрунтовано доцільність використання ферменту рослинного походження папаїну для ензиматичної фрагментації пептидоглікану. При співвідношенні фермент (папаїн) : субстрат 1 : 200 та тривалості процесу протягом 180 хв досягається найбільший вміст НМП у ферментолізатах (6,6 мг/см³). Доведено, що у складі продуктів ферментолізу містяться цільові сполуки – муропептиди, вміст яких сягає 38% від загальної кількості НМП при ферментолізі папаїном, 31% – панкреатином та 23% – протосубтиліном.

References

- Kapustyan, A.I., & Chernov, N.K. (2015). Perspektivy ispolzovaniya biologicheskii aktivnyih bakterialnyih gidrolizatov dlya nutritivnoy podderzhki naseleniya s rastroystvami immunooy sistemyi. Pischevaya nauka i tehnologiya. 2(31), 18–25. doi: 10.15673/2073-8684.31/2015.44263 (in Russian).
- Chernov, N., & Kapustyan, A. (2016). Immunological properties of the bacterial origin compounds. Food science and technology, 10(3), 19–28. doi: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v10i3.175>.
- Vavricka, S.R. (2004). hPepTl transports muramyl dipeptide, activating NF- κ B and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. Gastroenterology. 127, 1401–1409.
- Traub, S., Aulock, Von, S., Hartung, T., & Hermann, C. (2006). MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system. J Endotoxin Res. 12, 69–85. doi: 10.1179/096805106X89044.
- Qingshan, Lv. et al. (2012). MDP Up-Regulates the Gene Expression of Type I Interferons in Human Aortic Endothelial Cells. Molecules. 17, 3599–3608. doi: 10.3390/molecules17043599.
- Matsui, K., Matsui, K., & Ikeda, R. (2014). Peptidoglycan in combination with muramyl dipeptide synergistically induces an interleukin-10-dependent T helper 2-dominant immune response. Microbiol Immunol. 58, 260–265. doi: 10.1111/1348-0421.12139.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. 11, 373–384. doi: 10.1038/ni.1863.
- Chapot-Chartier, M.P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. Microb Cell Fact. 13, 1–9. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Matsumoto, S. et al. (2009). A component of polysaccharide peptidoglycan complex on Lactobacillus induced an improvement of murine model of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer. Immunology. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02942.x.
- Kühner, D., Stahl, M., Demircioglu, D.D., & Bertsche, U. (2014). From cells to muropeptide structures in 24 h: Peptidoglycan mapping by UPLC-MS. Sci. Rep. 4, 74–94. doi: 10.1038/srep07494.
- Regulski, K. (2012). Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of Lactobacillus casei and Characterization of the Major c-D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase. PLoS ONE. 7(2), e32301. doi: 10.1371/journal.pone.0032301.
- Gavrilin, M.V., Senchukova, G.V., & Senchenko, S.P. (2007). Vyibor optimalnyih usloviy polucheniya gidrolizatov molochnokislyih bakteriy termokislotnyim sposobom. Him.-farm. Zhurn. 41(2), 54–56 (in Russian).
- Senchenko, S.P., Samoylov, V.A., Gostischeva, N.M., Senchukova, G.V., & Gavrilin, M.V. (2005). Izuchenie sostava preparata, poluchennogo na osnove gidrolizata molochnokislyih bakteriy. Him.-farmats. Zhurn. 39(3), 51–53 (in Russian).
- Livinskaya, E.P., Kovalenko, N.K., & Garmasheva, I.L. (2011). Dezintegraciya laktobacill i ehnterokokkov dlya polucheniya fragmentov kletochnyh stенок. Mikrobiologichnij zhurnal. 73(3), 26–32 (in Russian).
- Ovsyannikova, L.V., & Komarova, E.L. (2012). Sravnytel'naya kharakterystyka proteolytycheskykh fermentov rastytel'noho proyskhozhdeniya – papayna y bromelayna, Dietary supplements market. 7(74), 3 (in Russian).

- Geiger, C., Spieb, T., Korn, S.M., Kötter, P., & Entian, K.-D. (2017), Specificity of subtilin-mediated activation of histidine kinase SpaK, *Appl Environ Microbiol.* 83. doi: 10.1128/AEM.00781-17.
- Golovach, T.N., Gavrilenko, N.V., Zhabanos, N.K., & Kurchenko, V.P. (2008). Zakonomirnosti hidrolizu syrovatkovykh bilkiv ekzo- I endoproteaz. Works BGU of Biochemistry. 3(1), 1–15 (in Russian).
- Yakubke, H.-D., & Eshkide, H. (1985), Aminokisloty, peptidy, belki. Trans. from gem. (in Russian).
- Semak, I.V., Zyryanova, T.N., & Gubich, O.I. (2007). Biohimiya belkov: praktikum dlya studentov biol. Fak. spets. 1-31 01 01 «Biologiya», Minsk: BGU (in Russian).
- Morris, D.L. (1948). Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, 107(2775), 254–255.
- Shaphaev, E.G. Tsyrenov, V.Zh., & Chebunina, E.I. (2015). Dezintegratsiya kletok v biotehnologii. Uchebnoe posobie, VSGTU, Ulan-Ude in Russian).