



УКРАЇНА

(19) UA (11) 142457 (13) U
(51) МПК (2020.01)
G01N 31/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

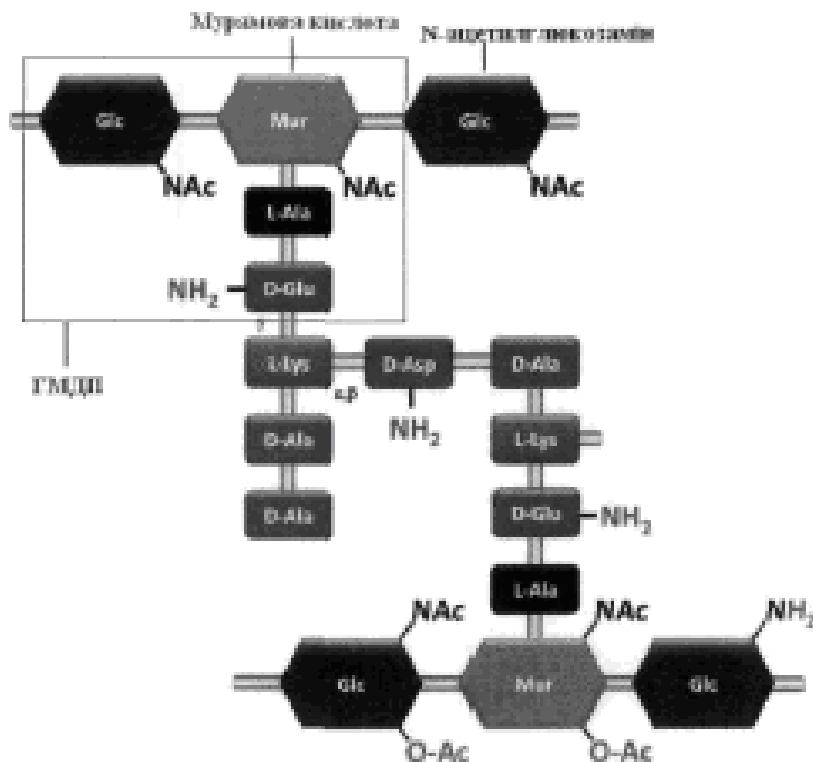
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 10888	(72) Винахідник(и): Капустян Антоніна Іванівна (UA), Черно Наталія Кирилівна (UA), Озоліна Софія Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 04.11.2019	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2020	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2020, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МУРОПЕПТИДІВ У СКЛАДІ БАКТЕРІАЛЬНИХ ГІДРОЛІЗАТІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення муропептидів, відповідно до якого, до гідролізату бактеріальних клітин додають розчин трихлороцтової кислоти з метою позбавлення від високомолекулярних білків, далі проводять нейтралізацію лугом із подальшим очищенням гідролізату від супутніх сполук, що утворюються в результаті деструкції клітини х стінок бактеріальних структур (нейтральних вуглеводів, органічних кислот, солей) шляхом використання іонообмінної хроматографії із застосуванням катіоніту КУ-2. Отриманий елюент висушують та використовують для визначення вмісту муропептидів з реактивом Антрона.



UA 142457 U

UA 142457 U

Корисна модель належить до біотехнології, фармакології, оздоровчого та лікувально-профілактичного харчування, харчових технологій, зокрема до способу визначення муропептидів в бактеріальних гідролізатах.

Загальноновизнаною проблемою сучасного суспільства є зниження його імунного статусу. Людина з діагнозом "понижений імунітет" найбільш вразлива до застудних, інфекційних та інших супутніх хвороб. Доцільним є введення в раціони харчування імуноотропних функціональних інгредієнтів.

Вельми перспективним є використання як імуноотропних харчових інгредієнтів певних структур мікроорганізмів муропептидів.

Муропептиди - нанооб'єкти, які мають усі необхідні для патоген-асоційованих молекулярних структур властивості, що виражаються в стимуляції вродженого імунітету і здатності формувати захист від мікробних інфекційних агентів у хребетних.

Екзогенне введення муропептидів відтворює фізіологічні та еволюційно закріплені механізми імунної відповіді. Існує ряд фармакологічних ін'єкційних та назальних препаратів постбіотичного походження з вмістом муропептидів, але із огляду того, що низькомолекулярні муропептиди можуть долати кишковий бар'єр, вони є перспективними імунокоригувальними компонентами пероральних форм дієтичних добавок та функціональних харчових інгредієнтів для нутритивної підтримки населення, що страждає розладами функціонування імунної системи. Незважаючи на те, що муропептиди є складовими пептидогліканів бактеріальних стінок, використання нативних мікробних клітин як функціональних імуноотропних інгредієнтів є малоефективним, адже сигналами для запуску імунної відповіді є їхні фрагменти. У зв'язку з цим, доцільною є керована часткова деструкція пептидогліканів бактеріальних клітин з метою отримання біологічно активних речовин, здатних легше засвоюватися і вступати в біохімічні процеси, прискорюючи очікуваний імуноотропний ефект.

Пептидоглікан - структурний біополімер, складає основну масу клітинної стінки грампозитивних бактерій (до 70 %), побудований чергуванням блоків N-ацетил мурамової кислоти та N-ацетилглюкозаміну, зв'язаних β 1 $\rightarrow$ 4 глікозидними зв'язками. Паралельні ланки повторюваних блоків мурамової кислоти та залишків N-ацетилглюкозаміну фіксуються пептидними місточками, зв'язаними ковалентними зв'язками з мурамовою кислотою. Дані пептиди побудовані переважно наступними амінокислотами: аланін, ізоглутамін, лізин, аспарагін, мезодіамінопімелін (див. креслення).

Існує проблема ідентифікації та кількісного визначення муропептидів у складі бактеріальних гідролізатів, оскільки в них міститься велика кількість супутніх речовин, які є перепорою для коректного аналізу.

У літературі найбільш часто зустрічаються наступні методи визначення муропептидів: визначення залишків мурамової кислоти у їхньому складі, визначення пептидних зв'язків, використання хроматографічних методів із застосуванням модельних зразків муропептидів.

Визначення мурамової кислоти у складі гідролізатів бактеріальних клітинних стінок проводять наступним чином: проби гідролізованого пептидоглікану, що містять від 5 до 50 мкг мурамової кислоти, вносять в пробірки, що загвинчуються кришками з тефлоновими прокладками, і нейтралізують рівним об'ємом 4 н. NaOH для видалення D-лактату з 3-го положення мурамової кислоти (див. креслення). Далі готують стандартні розчини, які містять 1-10 мкг молочної кислоти в складі мурамової кислоти. Об'єм усіх проб доводять до 1 мл дистильованою водою, додають 0,5 мл 1 н NaOH та інкубують при 37 °C протягом 30 хв. Потім додають 10 мл сірчаної кислоти, пробірки закривають і нагрівають 10 хв. у киплячій воді. Після охолодження додають 0,1 мл міді сульфату і 0,2 мл п-гідроксифенільного реактиву і швидко перемішують. Пробірки інкубують на водяній бані при 30 °C протягом 30 хв., після чого вимірюють оптичну щільність при 560 нм. Концентрацію мурамової кислоти визначають за стандартною калібрувальною кривою, що відображає залежність між оптичною щільністю в стандартних пробах і концентрацією в них мурамової кислоти (див. Методы общей бактериологии: Том 2. Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. - М.: Мир, 1984. - 472 с.).

Недоліком даного способу є те, що його використання не передбачено для визначення мурамової кислоти у складі муропептидів, які отримують в результаті дезінтеграції пробіотичних бактеріальних клітин. Такі гідролізати можуть містити вільний продукт метаболізму - D-лактат (молочну кислоту), а його наявність у вільному стані унеможливає використання даного методу, оскільки він включає фотоколориметричне визначення забарвлених сполук, утворених при взаємодії лактату, вивільненого зі складу мурамової кислоти, із міддю сульфатом і п-гідроксифенільним реактивом.

Визначення муропептидів у бактеріальних гідролізатах проводять також за допомогою якісних реакцій на пептидний зв'язок (з Біуретвим або реактивом Бенедикта) після осадження

високомолекулярних білків 20 %-вим розчином трихлороцтової кислоти (див. Гаврилин М.В. Выбор оптимальных условий получения гидролизатов молочнокислых бактерий термокислотным способом / М.В. Гаврилин, Г.В. Сеньчукова, С.П. Сенченко // Хим.-фарм. журн.- 2007. - Т. 41, № 2. - С. 54-56). Згідно з даним методом, пептиди, молекулярною масою до 1500 Да, що відповідають молекулярній масі муропептидів, визначали наступним чином: до 1 мл гідролізату додавали 1 мл розчину трихлороцтової кислоти (200 мг/мл), через 10 хв. осад відфільтровували, 0,5 мл фільтрату поміщали в пробірку, доводили водою дистильованою до об'єму 5 мл, додавали 0,5 мл розчину натрію гідроксиду (200 мг/мл), 0,5 мл розчину міді сульфату (II) концентрацією 20 мг/мл, вміст пробірки перемішували, залишали на 30 хв. за кімнатної температури. Осад відділяли центрифугуванням при 5000 хв.⁻¹ протягом 10 хв., оптичну густину супернатанту вимірювали при 553 нм у кюветі товщиною 1 см. Як контрольний розчин використовували суміш цих же реактивів без гідролізату. Концентрацію пептидів знаходили за калібрувальним графіком.

Головним недоліком даного методу є те, що він забезпечує визначення лише пептидних зв'язків білкових сполук у складі бактеріальних гідролізатів, але до складу молекулярної фракції пептидів до 1500 Да можуть входити не лише муропептиди, а й інші пептиди, які утворюються у ході дезінтеграції бактеріальних культур. Отже, використання даного методу для визначення муропептидів не є виправданим.

Для визначення муропептидів часто використовують методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та електрофоретичні методи. Так, у дисертації Сенченка С.П. "Разработка методов анализа и оптимизация состава лекарственного препарата на основе гидролизата молочнокислых бактерий" зазначено, що для аналізу ГМДП в таблетках лікопід використовується ВЕРХ, але для кількісного визначення ГМДП в гідролізатах використовували міцелярний варіант електрофорезу, коли до складу провідного електроліту вводиться додецилсульфат натрію в концентрації, що перевищує критичну концентрацію міцелуутворення.

Недоліками даних способів є те, що у першому випадку, метод не дає можливості кількісно визначити ГМДП у гідролізатах. Це пов'язано з тим, що ВЕРХ в обернено-фазовому варіанті має відносно низьку ефективність при аналізі сорбатів з високою полярністю, яка не дозволяє розділити ГМДП з іншими пептидами й амінокислотами, що утворюються в ході гідролізу. В обох способах необхідним є залучення високовартісного обладнання, яке може бути не доступним для випробувальних лабораторій.

Методи, описані в роботах Герхарда Ф., Гавриліна Г.В. та Сенченко С.П., та в інших відомих заявнику способах, вирішують дану задачу принципово іншим шляхом із використанням інших хімічних речовин. Спільним у заявці, що пропонується та вказаними вище, є тільки задача, яку вони вирішують - визначення муропептидів у бактеріальних гідролізатах.

У зв'язку з цим, жодне із відомих заявнику технічних рішень не може бути вибрано найближчим аналогом.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу визначення муропептидів у бактеріальних гідролізатах шляхом визначення вуглеводневої складової в їхній структурі за допомогою реактива Антрона із використанням як модельних муропептидів для побудування калібрувального графіка глюкозамінілмураміддипептиду (ГМДП).

Даний спосіб забезпечує визначення цільового продукту у складі бактеріальних гідролізатів - муропептидів, а не їхніх складових (мурамової кислоти або низькомолекулярних пептидів). Використання ГМДП як модельного зразка муропептидів для побудування калібрувального графіка за участю реактиву Антрона забезпечує високу точність аналізу. Також пропонується спосіб не передбачає використання високовартісних реактивів та обладнання, що забезпечує спрощення методу та зниження його собівартості.

Поставлена задача вирішена в способі визначення муропептидів, відповідно до якого, до гідролізату бактеріальних клітин об'ємом 1-100 мл з вмістом сухих речовин 1-20 % додають 1-100 мл розчину трихлороцтової кислоти концентрацією 5-25 % для осадження високомолекулярних білків, залишають на 5-40 хв., центрифугують протягом 5-30 хв., при 3-15 хв.⁻¹. Проводять декантацію, до надосадової рідини додають натрій гідроксид концентрацією 5-25 % до нейтральної реакції. Далі розчинну фракцію гідролізату піддають іонообмінній хроматографії з використанням катіоніту КУ-2 з метою позбавлення нейтральних цукрів, органічних кислот, продуктів метаболізму. Приготування колонки проводять за відомою методикою (Kapustian A., Chemo N. Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria. EUREKA: Life Sciences. 2018. - #1. - 24-31). 10-100 мл нейтралізованої надосадової рідини автолізату пропускають через колонку зі швидкістю 1-5 мл/хв. Далі колонку промивають 40-200 мл дистильованої води та проводять елювання адсорбованих катіонів (амінокислот, пептидів та муропептидів), пропускаючи через колонку 10-100 мл 6N NH₄OH зі швидкістю 1-5

мл/хв. Потім колонку промивають 40-500 мл води. Елюент відбирають об'ємом 20-100 мл, наявність білкових сполук у фракціях визначають якісною реакцією з розчином нінгідрину. Для цього відбирають 2 мл елюенту із кожної фракції та додають 1 % - вий розчин нінгідрину, суміш витримують на киплячій водяній бані протягом 10-30 хв. Наявність синьо-фіолетового забарвлення свідчить про наявність білкових речовин. Фракції елюенту з вмістом білкових речовин об'єднують та концентрують на водяній бані до вмісту сухих речовин 0,2-10 %, потім додають 10-100 мл води і знову випарюють для видалення слідів аміаку. Далі елюент піддають сублімаційному сушінню до вмісту сухих речовин 8-12 %. Отриманий препарат являє собою суміш амінокислот, низькомолекулярних пептидів та мурапептидів із молекулярною масою до 1500 Да світло-бежевого кольору. Для визначення вмісту мурапептидів проводять реакцію з реактивом Антрона, яка є якісною на вуглеводневу складову мурапептидів, а саме залишки піранозної форми глюкози у складі мурамової кислоти та глюкозаміну (див. графічний матеріал). Для цього готують 0,01-2 %-ві розчини отриманого препарату, відбирають 0,5-5 мл та додають реактив Антрона, який готують за відомою методикою (див. Morris D.L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent // Science. 1948. - 107 (2775). P. 254-255). Суміш витримують на киплячій водяній бані протягом 10-30 хв., та вимірюють оптичну густину на колориметрі при 625 нм у кюветі 10 мм відносно розчину порівняння. Розчин для порівняння готують як описано вище, але замість розчину досліджуваного препарату додають воду дистильовану. Вміст мурапептидів знаходять за калібрувальним графіком. Калібрувальний графік будують, використовуючи стандартний розчин мурапептидів, а саме ГМДП, структуру якого представлено на рисунку, у межах концентрацій 0,01 до 0,05 мг/мл.

Умови виконання способу визначено експериментальним шляхом. Об'єм бактеріального гіролізату для визначення вмісту мурапептидів у його складі обмежується інтервалом 1-100 мл, оскільки кількість мурапептидів у гіролізаті об'ємом до 1 мл може бути досить низькою, а отже, не достатньою для взаємодії вуглеводної складової мурапептидів із реактивом Антрона, що є головною передумовою для визначення мурапептидів даним способом. При аналізі вмісту мурапептидів об'ємом більше 100 мл, ймовірним є отримання не коректних результатів, оскільки у складі гіролізату може бути більше позитивно заряджених іонів, ніж аніонів катіоніту колонки, тому адсорбуючий потенціал іонообмінної колонки може бути вичерпано передчасно.

Рекомендована нижня межа інтервалу сухих речовин бактеріального гіролізату 1 % для визначення мурапептидів обумовлена не достатньою їхньою концентрацією для взаємодії вуглеводною складовою мурапептидів із реактивом Антрона, а перевищення верхньої межі - 20 %, може провокувати передчасне вичерпання потенціалу іонообмінної колонки, що не дасть змоги визначити повну кількість мурапептидів у гіролізаті.

Для осадження високомолекулярних білків використовують 1-100 мл розчину трихлороцтової кислоти, який вибирають у рівному об'ємному співвідношенні до бактеріального гіролізату.

Трихлороцтову кислоту використовують в інтервалі концентрацій 5-25 %, при концентрації кислоти нижче 5 % можливе не повне осадження високомолекулярних білків, а використання кислоти вище 25 % є недоцільним, оскільки вона є повністю достатньою для осадження максимальної кількості розчинних білків, що є у бактеріальному гіролізаті.

Суміш гіролізату та трихлороцтової кислоти залишають на 5-40 хв., інкубація суміші менше 5 хв., може бути недостатньою для перебігу реакції осадження високомолекулярних білків, а інкубація більше 40 хв., - недоречною, адже, виходячи із літературних та експериментальних даних, цього часу цілком достатньо для перебігу даної реакції.

Гіролізат центрифугують протягом 5-30 хв., при 3-15 хв.⁻¹. При центрифугуванні гіролізату за режимів нижче зазначених можлива седиментація не усіх завислих частинок, що є у суспензії гіролізату, що може провокувати ускладнення при подальшому проведенні дослідів з використанням іонообмінної колонки, перевищення верхніх меж режимів центрифугування є недоцільним, адже експериментальним шляхом доведено, що вони забезпечують повне осадження завислих частинок гіролізату.

Для нейтралізації трихлороцтової кислоти до надосадової рідини гіролізату додають натрій гідроксид концентрацією 5-25 %, межі якої обумовлено кількістю внесеної трихлороцтової кислоти.

Для очищення нейтралізованого гіролізату від нейтральних цукрів, органічних кислот, солей, використовують іонообмінну хроматографію з використанням катіоніту КУ-2, для чого беруть об'єм гіролізату в інтервалі 10-100 мл. Конкретний об'єм залежить від вмісту катіонів у конкретному гіролізаті та іонообміною здатністю колонки. Експериментальним шляхом встановлено, що нижня та верхня межі інтервалу є достатніми щодо взаємозв'язку вмісту

катіонів у бактеріальних гідролізатах та іонообміною здатністю колонки, зміщення даних меж є не доцільним.

Гідролізат пропускають через колонку зі швидкістю 1-5 мл/хв., швидкість менше 1 мл/хв., є недоцільною, оскільки за неї сорбуються усі катіони, а швидкість пропускання гідролізату через колонку більше 5 мл/хв., використовувати не можна, адже при цьому можлива не повна сорбція катіонів.

Далі колонку промивають 40-200 мл дистильованої води. Даний інтервал об'ємно взаємопов'язаний із кількістю внесеного гідролізату.

Потім через колонку пропускають 10-100 мл 6н розчину NH_4OH . Даний інтервал об'ємно взаємопов'язаний із кількістю внесеного гідролізату.

Розчин NH_4OH пропускають через колонку зі швидкістю 1-5 мл/хв., швидкість менше 1 мл/хв., є недоцільною, оскільки за неї сорбуються усі катіони NH_4^+ , а швидкість пропускання NH_4OH через колонку більше 5 мл/хв. використовувати не можна, адже при цьому можлива неповна сорбція катіонів.

Далі колонку промивають водою дистильованою об'ємом 40-500 мл для видалення катіонів та залишків NH_4OH . Даний інтервал об'ємно взаємопов'язаний із кількістю внесеного гідролізату та NH_4OH . Експериментальним шляхом встановлено, що даний режим промивання повністю задовольняє умови досліду.

При елююванні колонки розчином NH_4OH та дистильованою водою, збирають фракції об'ємом 20-100 мл. Дані межі інтервалу обумовлені вмістом білкових речовин в елюатах.

Далі у фракціях якісно визначають вміст білкових речовин з нінгідрином, фракції з вмістом білкових речовин об'єднують та концентрують на киплячій водяній бані до бажаного вмісту сухих речовин, далі концентрат сублімаційно висушують та залежно від концентрації муропептидів готують розчини та визначають в них вміст муропептидів за калібрувальним графіком.

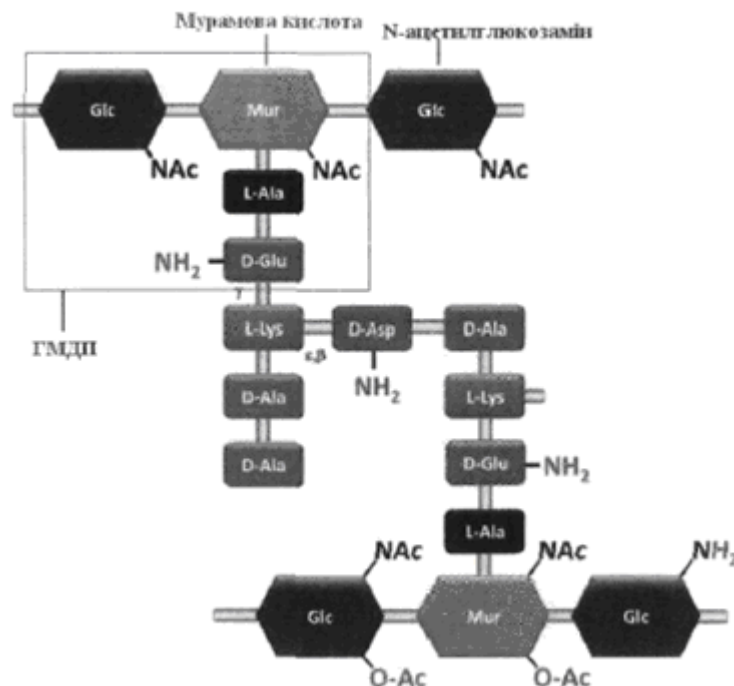
Новим у корисній моделі, що заявляється, є використання принципово нового підходу до визначення муропептидів у бактеріальних гідролізатах. Спосіб забезпечує визначення цільового продукту у складі бактеріальних гідролізатів, використання ГМДП як модельного зразка муропептидів забезпечує високу точність аналізу, спосіб не включає використання високовартісних реактивів та обладнання, що забезпечує спрощення методу та зниження його собівартості.

Приклад 1. До гідролізату бактеріальних клітин, отриманих за відомим способом (див. Kapustian A., Chernon N., Kolomiets I. Obtaining and characteristic of muropeptides of probiotic cultures cell walls // Food science and technology. 2018. - Vol. 12, Issue 1. - P. 11-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v12i1.885>), об'ємом 50 мл з вмістом сухих речовин 6 % додавали 20 мл розчину трихлороцтової кислоти концентрацією 20 % для осадження високомолекулярних білків, залишали на 30 хв., центрифугували протягом 10 хв., при 5 хв.⁻¹. Проводили декантацію, до надосадової рідини додавали натрій гідроксид концентрацією 10 % до нейтральної реакції. Далі розчинну фракцію гідролізату піддавали іонообмінній хроматографії з використанням катіоніту КУ-2 з метою позбавлення нейтральних цукрів, органічних кислот, продуктів метаболізму. Приготування колонки проводили за відомою методикою (Kapustian A., Chernon N. Obtaining and characteristic of the autolysate of lactic acid bacteria. EUREKA: Life Sciences. 2018. - #1. - 24-31), 50 мл нейтралізованої надосадової рідини автолізу пропускали через колонку зі швидкістю 1 мл/хв. Далі колонку промивали 100 мл дистильованої води та проводили елюювання адсорбованих катіонів (амінокислот, пептидів та муропептидів) пропускаючи через колонку 50 мл 6н NH_4OH зі швидкістю близько 1 мл/хв. Потім колонку промивали 200 мл води. Елюент відбирали об'ємом 50 мл, наявність білкових сполук у фракціях визначали якісною реакцією з розчином нінгідрину. Для цього відбирали 2 мл елюенту із кожної фракції та додавали 1 % - вий розчин нінгідрину, суміш витримували на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Наявність синьо-фіолетового забарвлення свідчило про наявність білкових речовин. Фракції елюенту з вмістом білкових речовин об'єднували та концентрували на водяній бані до вмісту сухих речовин 6 %, потім додавали 50 мл води і знову випарювали для видалення слідів аміаку. Далі елюент піддавали сублімаційному сушінню до вмісту сухих речовин 8 %. Отриманий препарат являв собою суміш амінокислот, низькомолекулярних пептидів та муропептидів з молекулярною масою до 1500 Да світло-бежевого кольору. Далі готували 0,01 %-ві розчини отриманого препарату, відбирали 0,5 мл та додавали реактив Антрона, який готували за відомою методикою (див. Morris D.L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent // Science. 1948. - 107 (2775). - P. 254-255). Суміш витримували на киплячій водяній бані протягом 10-30 хв., та вимірювали оптичну густину на колориметрі при 625 нм у кюветі 10 мм відносно розчину порівняння. Розчин для порівняння готували як описано вище,

але замість розчину досліджуваного препарату додавали воду дистильовану. Вміст муропептидів знаходили за калібрувальним графіком. Калібрувальний графік будували використовуючи стандартний розчин муропептидів, а саме глюкозаманілмураміддипептиду (ГМДП), структуру якого представлено у графічному матеріалі, у межах концентрацій 0,01 до 0,05 мг/мл. За результатами експерименту визначено, що згідно з калібрувальним графіком, вміст муропептидів у досліджуваному гідролізаті складав 1,2 мг/мл.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення муропептидів, відповідно до якого, до гідролізату бактеріальних клітин з вмістом сухих речовин 1-20 % додають 1-100 мл розчину трихлороцтової кислоти концентрацією 5-25 %, залишають на 5-40 хв, центрифугують протягом 5-30 хв при 3-15 хв⁻¹, проводять декантацію, до надосадової рідини додають натрій гідроксид концентрацією 5-25 % до нейтральної реакції, розчинну фракцію гідролізату піддають іонообмінній хроматографії з використанням катіоніту КУ-2, для чого 10-100 мл нейтралізованої надосадової рідини автолізату пропускають через колонку зі швидкістю 1-5 мл/хв, далі колонку промивають 40-200 мл дистильованої води та проводять елювання адсорбованих катіонів амінокислот, пептидів та муропептидів, пропускаючи через колонку 10-100 мл 6н NH₄OH зі швидкістю 1-5 мл/хв, потім колонку промивають 40-500 мл води, елюент відбирають об'ємом 20-100 мл, визначають наявність білкових сполук у фракціях якісною реакцією з розчином нінгідрину, для чого відбирають 2 мл елюенту із кожної фракції та додають 1 %-вий розчин нінгідрину, суміш витримують на киплячій водяній бані протягом 10-30 хв, фракції елюенту з вмістом білкових речовин об'єднують та концентрують на водяній бані до вмісту сухих речовин 0,2-10 %, потім додають 10-100 мл води і знову випарюють для видалення слідів аміаку, елюент піддають сублімаційному сушінню до вмісту сухих речовин 8-12 %, готують 0,01-2 %-ві розчини отриманого препарату, відбирають 0,5-5 мл та додають реактив Антрона, суміш витримують на киплячій водяній бані протягом 10-30 хв та вимірюють оптичну густину на колориметрі при 625 нм у кюветі 10 мм відносно розчину порівняння, а вміст муропептидів знаходять за калібрувальним графіком, який будують, використовуючи стандартний розчин глюкозаманілмураміддипептиду у межах концентрацій 0,01-0,05 мг/мл.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що використовують гідролізат бактеріальних клітин об'ємом 1-100 мл.



Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601