

Sposób otrzymywania biokatalizatorów przez immobilizację białek katalitycznych w matrycy polimerowej

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania biokatalizatorów przez immobilizację białek katalitycznych w matrycy polimerowej metodą enkapsulacji.

Ze względu na znaczne uproszczenie operacji wydzielenia produktów reakcji i możliwość realizacji procesów w wariacie ciągłej syntezy w przemyśle preferowane są katalizatory nierozpuszczalne w środowisku reakcji. Niedogodnością tych rozwiązań jest zwykle mniejsza regio- i stereoselektywność reakcji w porównaniu z katalizatorami homogenicznymi. Istnieje zatem wyraźna potrzeba opracowania nowych koncepcji katalizy zwłaszcza w technologiach ukierunkowanych na małotonażowe, produkcje substancji chemicznych wysokiej czystości, minimalizacja zagrożenia środowiska poprzez eliminację rozpuszczalników organicznych. Wprowadzane powszechnie zasady „zielonej chemii” w dużej mierze oparte są na wykorzystaniu unieruchomionych biokatalizatorów, zwykle enzymów, i prowadzeniu procesów w reaktorach przepływowych. Biokatalizatory wielokrotnego stosowania wykazują bardzo wysoką selektywność, zwiększają wydajność procesów, obniżają koszty i zmniejszają zagrożenie środowiska. Jak dotychczas nie opracowano ogólnej efektywnej metody immobilizacji.

W metodach immobilizacji ważny jest właściwy dobór nośnika i techniki immobilizacji, ponieważ decydują one o aktywności unieruchomionego biokatalizatora oraz wydajności procesu technologicznego. Dobór nośnika i jego budowy fizykochemicznej oraz dobór warunków immobilizacji są zawsze ukierunkowane na maksymalizację aktywności preparatu enzym-nośnik. Uważa się, że dobry nośnik powinien wykazywać następujące cechy: obojętność w stosunku do biokatalizatorów; prostota i łagodne warunki immobilizacji; duża zdolność wiązania biokatalizatora; wysoka mechaniczna stabilność; stabilność chemiczna w warunkach prowadzenia procesów i przy przechowywaniu; duża zdolność dyfuzyjna w stosunku do substratu i produktu; możliwość regeneracji i kilkakrotnego użycia; łatwa dostępność; niski koszt; możliwość zastosowania w skali przemysłowej.

Określenie „stabilność immobilizowanych enzymów” nie jest terminem jednoznacznym. W literaturze zwiększenie stabilności związanego enzymu jest rozumiane jako: mniejsza podatność na agregację; mniejsza podatność na atak enzymów proteolitycznych; większa trwałość w warunkach przechowywania bez stabilizatorów; większa termostabilność; brak

autolizy; większa stabilność konformacyjna w obecności rozpuszczalników organicznych i cieczy jonowych.

Obecnie do najpowszechniej wdrażanych metod immobilizacji białek i komórek należą: unieruchamianie na powierzchni nośnika, unieruchamianie wewnątrz nośnika, oraz unieruchamianie bez nośnika.

Unieruchamianie na powierzchni to stosunkowo prosta i tania metoda stosowana w momencie gdy biokatalizator posiada powinowactwo do nośnika. Unieruchamianie zachodzi na zasadzie adsorpcji lub adhezji na wewnętrznej lub zewnętrznej powierzchni nośnika, dzięki tworzeniu wiązań van der Waalsa, jonowych, kowalencyjnych, hydrofobowych. Nośnikami stosowanymi w tej metodzie są m.in.: szkło porowate, pochodne celulozy, żywice jonowymienne, ziemia krzemkowa, wióry bukowe, skały wulkaniczne (pumeks), DEAE-celuloza. Wadą tej metody jest słabe wiązanie białka z nośnikiem, przechodzenie do medium reakcyjnego i w konsekwencji spadek aktywności katalitycznej, podatność na rozkład działaniem enzymów i mikroorganizmów.

Inny wariant immobilizacji polega na „zamykaniu” komórek w materiałach włóknistych lub porowatych. W metodzie tej wyróżnia się pułapkowanie oraz zamykanie wewnątrz membran półprzepuszczalnych. Pułapkowanie (inkluzja) to unieruchamianie w matrycy żelu, która najczęściej jest w kształcie kuleczki o średnicy 0,3-3 mm, ale może być również w formie sferycznej czy dysków. Najpowszechniej stosowany nośnik to alginian, poza tym stosuje się również kappa-karagenian, chitozan, agar, pektynę, żywice epoksydowe, poliakryloamid. [Won K., Kim S., Kim K.J., Park H.W., Moon S.J., Optimization of lipase entrapment In Ca – alginate gel beads. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2149-2154, Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O., Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 1989, 33, 79-89]

Najpowszechniej stosowana technika to zawieszanie białek lub komórek w alginianie sodu i wkraplanie tej mieszaniny do roztworu chlorku wapnia, w ten sposób otrzymuje się porowate kulki z uwięzionym biokatalizatorem: biomasą mikroorganizmów lub białkiem enzymatycznym. Żel alginianu wapnia jest jednym z najczęściej stosowanych nośników do immobilizacji materiału biologicznego. Wynika to z faktu, że immobilizacja całych komórek i enzymów w granulach utworzonych z żelu alginianowego jest bardzo prostym procesem, który może być przeprowadzony w łagodnych warunkach. Zazwyczaj materiał poddawany immobilizacji jest mieszany z roztworem alginianu sodu i wkraplany do roztworu zawierającego jony wapniowe. W wyniku wymiany jonów sodowych na wapniowe zachodzi natychmiastowe żelowanie, prowadzące do pułapkowania materiału biologicznego w porach

matrycy alginianowej, z której utworzone są kuliste granulki. W przypadku immobilizacji enzymów istnieje możliwość stopniowego ich uwalniania się z matrycy alginianowej. W niektórych przypadkach uzyskiwano nawet wysokie sprawności pułapkowania, ale podczas eksploatacji immobilizowanego biokatalizatora obserwowano wyraźny spadek jego aktywności, który tłumaczono uwalnianiem się enzymu z matrycy alginianowej. Wymywaniu enzymu można zapobiec zwiększając znacznie stopień usieciowania polimeru, ale wtedy obserwuje się znaczne zmniejszenie szybkości dyfuzji.

Zastosowanie biomateriałów immobilizowanych stwarza korzyści technologiczne oraz ekonomiczne w porównaniu z tradycyjnymi procesami wykorzystującymi natywne biokatalizatory wprowadzane do medium reakcyjnego. [Bednarski W., Reps A., Biotechnologia żywności, Wyd. Nauk.-Tech., 2001, Warszawa] Do korzyści tych można zaliczyć: wydłużenie aktywności i stabilności biokatalizatora, ponieważ nośnik może działać ochronnie w przypadku zmian pH, temperatury i składu podłoża; zwiększenie gęstości białka w przeliczeniu na jednostkę objętości fermentora, co prowadzi do wyższej produktywności, skrócenia czasu procesu; lepsze wykorzystanie substratu, w związku z czym proces przebiega z wyższą wydajnością; możliwość prowadzenia procesów ciągłych; ograniczenie występowania zakażeń mikrobiologicznych; obniżenie pracochłonności i kosztów procesu, ponieważ biokatalizator wykorzystywany jest przez długi okres czasu.

Do często proponowanych metod immobilizacji biokatalizatorów należy adsorpcja na żywicach jonowymiennych. Żywice jonowymienne są to najczęściej komercyjne produkty dostępne w postaci drobnych kulek (16 ÷ 400 mesh, 1180- 38 mikrometrów średnicy). Porowatość, a więc zdolność do wiązania katalizatora zależy od stopnia usieciowania polimeru [Ahmed, M. ; Malik, M. ; Pervez, S. ; Raffiq, M. Eur. Polym. J. 2004, 4, 1609] Nisko usieciowane żywice (0,5-2%) mają żelową (mikroporowatą) strukturę, podczas gdy przy wyższych stopniach usieciowania żywice są makroporowate. Porowatość wpływa na właściwości biokatalizatora. Przy niskim usieciowaniu pojemność żywicy, szybkość dyfuzji substratów i produktów silnie rośnie, natomiast zdecydowanie pogarsza się odporność na działania czynników takich jak ciśnienie, erozja. Natomiast żywice makroporowate są bardzo stabilne, odporne na działanie temperatury i rozpuszczalników organicznych, ale ich zdolność do wiązania enzymów jest znacznie mniejsza niż żywic żelowych.(Bednarski W., Reps A., Biotechnologia żywności, Wyd. Nauk.-Tech., 2001, Warszawa)

W toku badań nad immobilizacją enzymów typu hydrolaz na żywicach jonowymiennych potwierdziły się wymienione wyżej niedogodności tej metody. Aktywność katalityczna wyraźnie zmniejszała się w kolejnych cyklach z uwagi na wymywanie białka. Z

kolei badania nad enkapsulacją z użyciem alginianu lub kappa-karagenianu prowadziły do uzyskania biokatalizatora immobilizowanego. Aby uzyskać odpowiednią odporność biokatalizatora na działanie czynników mechanicznych należało dążyć do wysokiego stopnia usieciowania poprzez zwiększenie stężenia polisacharydu i czynnika sieciującego: soli wapniowych lub potasowych. Uzyskuje się tą metodą stabilne biokatalizatory w postaci granulek, ale aktywność biokatalizatora jest mniejsza z uwagi na znaczne spowolnienie dyfuzji substratów i produktów reakcji przez błonę usieciowanego alginianu. Obserwowane ograniczenia można pokonać prowadząc immobilizację w porowatych żywicach jonowymiennych w formie solnej i po adsorpcji enzymu dodając kontrolowaną ilość polisacharydu. Następuje utworzenie warstwy ochronnej o niewielkim stopniu usieciowania. Tym samym dyfuzja substratów i produktów nie jest utrudniona. Katalizator może być wielokrotnie użyty ponieważ nie następuje wymywanie białka.

Sposób według wynalazku polega na tym, że polimer zawierający kwaśne grupy funkcyjne, karboksylową, sulfonową, wodorosiarczanową w formie wapniowej, magnezowej, potasowej sterylizuje się przez przemycie wodnym roztworem alkoholu metylowego lub etylowego, usuwa rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie adsorbuje się białko katalityczne wprowadzając polimer do wodnego buforowego roztworu enzymu prowadząc proces w temperaturze nie wyższej niż 40°C, a następnie traktuje wodnym roztworem polisacharydu o stężeniu nie wyższym niż 5%, w czasie nie dłuższym niż 24 godziny, odmywa wodą nadmiar polisacharydu uzyskując immobilizowany biokatalizator.

Stosuje się jako polimer żywice polistyrenosulfonowe makroporowate lub żelowe, kationity zawierające grupę sulfonową lub karboksylową w formie wapniowej, magnezowej a jako polisacharyd alginian sodowy.

Stosuje się polimer polistyrenowy w formie potasowej, a jako polisacharyd- kappa karagenian .

Odpowiednio dobrany nośnik polimerowy, o dużej porowatości zapewnia znakomitą odporność mechaniczną otrzymanego biokatalizatora, pozwala to na uzyskanie biopolimeru o wysokiej koncentracji białka i tym samym katalizator jest bardzo aktywny. Otrzymany biokatalizator pracuje doskonale zarówno w procesach prowadzonych periodycznie jak i w procesach ciągłych.

Wynalazek bliżej objaśniają przykłady:

Przykład 1

Kationit makroporowaty Amberlyst 15 w formie wodorowej (Serva, <300 μm , 4.7 meq/mL suchej masy) [10g] przeprowadzono w formę wapniową przemywając wodnym 2% roztworem chlorku wapniowego [200ml/porcja]. Następnie jonit przemywano wodą do uzyskania odczynu obojętnego, przemyto wodnym, 20% roztworem alkoholu metylowego celem sterylizacji i liofilizowano, umieszczono w eksykatorze próżniowym nad bezwodnym chlorkiem wapniowym.]. Roztwór enzymu otrzymano poprzez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Oznaczone stężenie białka wynosi 50 mg/ml. Otrzymany jonit [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Otrzymany biokatalizator umieszczono w kolumnie i przemywano buforem octanowym [10ml] o pH 5,0. Oznaczono zawartość białka w przesączu i na tej podstawie określono zawartość enzymu związanego z żywicą jonowymienną [44,5mg]. Aktywność biokatalizatora określono prowadząc hydrolizę substratu, salicyny. Otrzymane złożo unieruchomionego biokatalizatora umieszczono w kolumnie połączonej z pompą perystaltyczną zapewniającą ciągły przepływ i przemywanie złoża mieszaniną reakcyjną. Reakcję prowadzono poprzez przemywanie [5ml/min] złoża 0.5% roztworem salicyny [10ml] w 50mM buforze octanowym o pH 5.0 w temperaturze 25°C, próbki pobierano co 2 minuty , oznaczano D-glukozę metodą Samogyi-Nelsona. W tym celu do 100 μl mieszaniny odczynników miedziowych I i II (w proporcji 25:1) dodano 100 μl pobranej mieszaniny reakcyjnej, co następnie wstawiono do termobloku [100°C] na 20 min. Po upływie wyznaczonego czasu próbki ochłodzono, dodano 100 μl odczynnika arseno-molibdenowego i energicznie wytrząsano, po czym dodano 700 μl wody destylowanej. Następnie używając płytek 96-dołkowych zmierzono absorbancje roztworów pobierając 200 μl próbki/dołek, wykonując pomiar w trzech technicznych powtórzeniach przy długości fali 660nm w odniesieniu do krzywej wzorcowej określającej zależność stężenie D-glukozy/absorbancja. Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 31,98U [10,15U/g biokatalizatora, 0,72U/mg białka], stopień zatrzymania białka wynosił 89%, a wydajność immobilizacji 64%.

Wydajność immobilizacji oceniano z punktu widzenia uzyskanych wydajności ze wzoru:

$$\text{Wydajność (\%)} = B/A \times 100$$

Gdzie A- aktywność enzymu w roztworze użytym do immobilizacji, B- aktywność immobilizowanego enzymu.

Przykład 2

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1 ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1 ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem alginianu sodowego [200 μ l] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [800 μ l]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [5,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową [45,5mg]. Następnie przeprowadzono reakcję enzymatyczną i analizowano jej przebieg jak w przykładzie 1.

Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 36,02 U [11,43U/g biokatalizatora, 0,79U/mg białka], stopień zatrzymania białka wynosił 91%, a wydajność immobilizacji 72%.

Przykład 3

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem alginianu sodowego [500 μ l] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [500 μ l]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [3,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową [46,5mg]. Następnie przeprowadzono reakcję enzymatyczną i analizowano jej przebieg jak w przykładzie 1.

Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 30,42 U [9,66 U/g biokatalizatora, 0,65U/mg białka], stopień zatrzymania białka wynosił 93%, a wydajność immobilizacji 61%.

Przykład 4

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem alginianu sodowego [1ml]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [4mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową.[46mg]. Następnie przeprowadzono reakcję enzymatyczną i analizowano jej przebieg jak w przykładzie 1.

Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 32,19 U [10,22 U/g biokatalizatora, 0,70U/mg białka], stopień zatrzymania białka wyniósł 92%, a wydajność immobilizacji 64%.

Przykład 5

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem alginianu sodowego [1ml]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [2,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową.[47,5mg]. Następnie przeprowadzono reakcję enzymatyczną i analizowano jej przebieg jak w przykładzie 1.

Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 32,19 U [9,85 U/g biokatalizatora, 0,70U/mg białka], stopień zatrzymania białka wyniósł 95%, a wydajność immobilizacji 62%.

Przykład 6

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1 ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1 ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem *kappa*-karagenianu [200 μ l] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [800 μ l]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [22,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową [27,5mg]. Następnie przeprowadzono reakcję enzymatyczną i analizowano jej przebieg jak w przykładzie 1.

Obliczona aktywność biokatalizatora wynosiła 12,90 U [4,10 U/g biokatalizatora, 0,47U/mg białka], stopień zatrzymania białka wynosił 55%, a wydajność immobilizacji 26%.

Przykład 7

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1 ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1 ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem alginianu sodowego [200 μ l] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [800 μ l]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [5,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową [45,5mg]. Następnie tak przygotowane złoże przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0 przez 72 godziny, po czym oznaczono zawartość białka w roztworze buforowym [4,1mg] i określono stopień wymycia białka ze złoża, który wynosił 9,0%.

Stopień wymycia białka oceniano z punktu widzenia wyznaczonych ilości białka ze wzoru:

Wymycie (%) = $C/D \times 100$

Gdzie C – ilość białka określona w buforze po przemyciu przez 72 godziny, D – ilość białka związanego z matrycą polimerową (zimmobilizowanego).

Przykład 8

Kationit Amberlyst 15 [1g] przygotowany jak w przykładzie 1 zadano wodnym roztworem enzymu [1ml]. Roztwór do immobilizacji przygotowano przez zmieszanie 1ml roztworu enzymu uzyskanego przez rozpuszczenie osadu amonowego biokatalizatora [β -glukozydaza *Aspergillus Niger K0440*, 100U] w wodnym roztworze buforu octanowego [1ml]. Stężenie białka wynosiło 5%. Jonit w formie wapniowej [1g] zadano wodnym roztworem enzymu [1ml], po zmieszaniu umieszczono w lodówce w temperaturze 8°C na 24 godziny. Następnie jonit mieszano z wodnym 2,0% roztworem *kappa*-karagenianu [200 μ l] oraz 50mM buforem octanowym o pH=5,0 [800 μ l]. Po zmieszaniu złoże pozostawiono w lodówce na czas 24h, następnie umieszczono je w kolumnie, gdzie przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0. Oznaczono zawartość białka w przesączu [22,5mg] i określono zawartość białka związanego z matrycą polimerową [27,5mg]. Następnie tak przygotowane złoże przemywano 50mM buforem octanowym [10ml] o pH 5.0 przez 72 godziny, po czym oznaczono zawartość białka w roztworze buforowym [5,0mg] i określono stopień wymycia białka ze złoża, który wynosił 18,2%.

