Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Inwertaza – enzym pozyskiwany z komórek drożdżowych: wybrane metody izolacji,oznaczania i oczyszczania



Wszystkie reakcje chemiczne zachodzące w organizmie katalizowane są przez tzw. katalizatory komórkowe znane jako biokatalizatory lub enzymy. Wszystkie enzymy są wielkocząsteczkowymi katalizatorami o charakterze białkowym i wytwarzane sa wyłącznie przez żywe komórki. Charakterystyczną cechą enzymów jest fakt, że mają one zdolność działania także poza komórkami, a dodatkowo związki te odznaczają się bardzo dużą swoistością. O swoistości enzymu decyduje przestrzenne ułożenie reszt aminokwasowych tworzących tzw. miejsce aktywne enzymu oraz ich właściwości. Pod względem chemicznym enzymy zaliczane są do białek prostych lub złożonych [2], [11].

Enzymy mają zdolnosc zmieniania szybkości reakcji, przy czym same nigdy nie ulegają zmianie. W przypadku braku enzymu dana reakcja chemiczna może zachodzi bardzo wolno, zaś po jego dodaniu szybkość reakcji może wzrosnąć nawet do 107 razy. Reakcje, które katalizowane są przez enzymy zazwyczaj charakteryzują się względnie łagodnymi warunkami przebiegu: temperatura reakcji zazwyczaj jest niższa niż 100 st.C, a pH jest obojętne [11].

Każdy enzym ma swoje charakterystyczne miejsce, określane mianem „miejsca aktywnego". Miejsce aktywne ma za zadanie wiązanie danego substratu w reakcji i przemienianie go w produkt [11]. Miejsce aktywne zajmuje niewielką część całkowitej objętości cząsteczki i jest układem przestrzennym - w jego skład wchodzą grupy chemiczne, które ułożone są w różnych pozycjach liniowej sekwencji aminokwasów [13].

Izolowanie enzymów

Ze względu na fakt, że enzymy nie występują w komórkach w stanie wolnym, konieczne jest ich wyodrębnienie ze struktur z którymi są związane. Tak więc, proces izolacji zazwyczaj rozpoczyna się od zniszczenia tkanek z równoczesnym zachowaniem właściwości katalitycznych enzymów. Standardowo przeprowadzanym etapem jest homogenizacja w młynkach wysokoobrotowych. By wytrącić struktury białkowe, po rozdrobnieniu materiał biologiczny traktuje się schłodzonymi rozpuszczalnikami organicznymi - najczęściej acetonem lub etanolem. W większości metod izolacji te dwa etapy łączy się w jeden, prowadząc tym samym rozdrabnianie z dodatkiem schłodzonego acetonu, co w ostateczności prowadzi do otrzymania preparatu enzymatycznego w postaci proszku [4].

Enzymy izoluje się takimi metodami, które pozwalają na ich otrzymanie w stanie jednorodnym, a dodatkowo nie powoduja utraty aktywności enzymatycznej. Związki te są zazwyczaj nie trwałe w pH poniżej 5 i powyżej 9, bardzo łatwo ulegają denaturacji cieplnej oraz denaturacji powierzchniowej, a dodatkowo ulegają inaktywacji w roztworach zawierających sole metali ciężkich. Biorąc pod uwagę wszystkie wymienione czynniki, opracowano metody izolacji enzymów, które

opierają się na przeprowadzaniu całej preparatyki w buforach o pH ok. 7, cały proces prowadzi się w niskiej temperaturze, a dodatkowo stosuje się podwójnie destylowaną wodę , a także środki kompleksujące metale ciężkie [2].

Do izolacji enzymów rozpuszczalnych (np. tych które znajdują się w cytoplazmie) stosuje się ekstrakcję wodą bądź rozcieńczonymi roztworami soli. Enzymy będące mocno „uwięzione" w ziarnistościach komórek ekstrahuje się po rozdrobnieniu tkanek w homogenizatorze, a dodatkowo wykorzystuje się zamrażanie i odtajanie, ekstrakcję butanolem, wprowadzenie odpowiednich detergentów itp. [2].

Oznaczanie enzymów- pomiar aktywności enzymu

W powszechnie stosowanych metodach pomiaru aktywności enzymu pod uwagę bierze się szybkośc pojawienia się produktu w danej reakcji enzymatycznej lub szybkość zuśywania substratu w reakcji. Jeżeli dany substrat lub produkt mają zdolność absorbowania światła o określonej długości fali możliwe jest sledzenie zmian absorbancji przy tej dlugości fali. Do powyższych pomiarów wykorzystuje się spektrofotometr, a także opiera się na założeniu, że absorbancja w danym zakresie jest proporcjonalna do stężenia, a szybkość zmiany absorbancji jest proporcjonalna do aktywności enzymu. Aktywność enzymu wyrażana jest w molach zużytego substratu bądź wytworzonego w trakcie reakcji produktu w jednostce czasu [11]. Tak więc, zawartość enzymu wyraża sie w jednostkach, które definiowane są jako: „takie ilości enzymu, które wywołuja określoną szybkość reakcji, wyrażoną zwykle przez ubytek substratu lub pojawienie się produktu w określonych warunkach"..[Kłyszejko s. 476-477]. Do pomiarów absorbancjo mających na celu oznaczenie enzymów, zazwyczaj wykorzystuje się cząsteczki dwóch koenzymów tj. zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) oraz NADPH- tj. zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego[11].

Aktywność enzymatyczna w tkankach

Najczęściej aktywność enzymów bada się w homogenatach tkankowych lub skrawkach tkanek. Bardzo rzadko oznaczenie prowadzi się w wyizolowanych komórkach czy tez w zawiesinie pojedynczych komórek. By wykonać oznaczenie w tkankch, jako pierwszy etap należy przeprowadzić homogenizację tkanki z sola fizjologiczną, chlorkiem potasu lub z sacharozą. Tkanka musi być wcześniej dokładnie zważona. Aktywność enzymatyczna może być oznaczana albo w pełnym homogenacie, albo dopiero po odwirowaniu z próbki jąder komórkowych i błon. Możliwe jest również oznaczenie w homogenacie poddanym wcześniej tzw. wirowaniu różnicowemu, dzięki czemu możliwe jest badanie aktywności enzymów w uzyskanych po wirowaniu frakcjach (np. w jądrach komórkowych czy mitochondriach) [2].

Aktywność danego enzymu w przygotowanym homogenacie zależy od wielu czynników m.in. od:

- ilości wykorzystanego homogenatu
- zastosowanej homogenizacji (użytych związków, szczelności homogenizatora, czas prowadzonej homogenizacji, temperatura).
- czas między pobraniem danej tkanki, a pomiarem aktywności enzymów (po całkowitej homogenizacji przygotowującej do pomiaru) [2].

Aktywność danego enzymu zazwyczaj oblicza się albo w odniesieniu do masy świeżej lub wysuszonej tkanki, zawartości w otrzymanym homogenizacie białka, lub azotu całkowitego. Ponadto, jeżeli znamy zawartość DNA (wartość ta jest identyczna dla wszystkich komórek somatycznych danego wielokomórkowego organizmu), możliwe jest przeliczenie uzyskanej aktywności enzymatycznej na

jedną komórkę [2].

Oczyszczanie i frakcjonowanie enzymów

Do frakcjonowania najczęściej wykorzystuje się różne roztwory soli oraz rozpuszczalniki organiczne. Wśród soli zazwyczaj wykorzystuje się siarczan amonu,zaś z detergentów: aceton, etanol lub eter. Do oczyszczania enzymów stosuje się powszechnie znane i dobrze działające metody jak: chromatografia, elektroforeza czy ultrawirowanie, których zaleta jest to, że pozwalają na oczyszczenie prawie każdego enzymu. Coraz częściej stosuje się też chromatografię powinowactwa bądź krystalizację [2].

By uzyskać wiarygodny pomiar aktywności danego enzymu, w mieszaninie reakcyjnej muszą znajdować się wszystkie niezbędne substraty i kofaktory, a co więcej muszą one być w takich stężeniach, aby monitorowana aktywność enzymu zależała tylko i wyłącznie od poziomu analizowanego enzymu w danym materiale. Wszystkie warunki pomiaru muszą być indywidualnie dostosowane do enzymu jaki chcemy zmierzyć. By móc optymalizować metody pomiaru konieczny jest dobór odpowiedniego buforu (o określonej sile jonowej i pH). Bardzo ważne jest również określenie czasu reakcji, dzięki czemu ogranicza się hamowanie reakcji przez powstające w trakcie produkty reakcji [12].

Metody analityczne wykorzystywane do określania aktywności enzymów

Wśród tych metod wyróżnia się metody klasyczne, takie jaki np. miareczkowanie lub metody instrumentalne (np. spektrofotometryczne, polarymetryczne, potencjometryczne). Najbardziej popularne metody opierają się na pomiarze absorpcji światła w wybranym zakresie fal. Zakres ten obejmuje zazwyczaj od 300 do 400 nm, dzięki czemu możliwe jest określenie zmian stężenia wybranego substratu lub produktu w danej reakcji [4].

Metoda analityczna stosowana do określania aktywności enzymów wymaga doboru optymalnych warunków w jakich przebiega dana reakcja enzymatyczna, a dodatkowo muszą być uwzględnianie także możliwości pomiaru. Gdy nie dysponujemy dostatecznie czułą aparaturą pomiarową należy odpowiednio zmodyfikować postępowanie analityczne, by uzyskać możliwie największe wartości mierzonych parametrów. W tym celu można albo wydłużyć czas inkubacji, albo zmienić wykorzystywany w danej reakcji substrat, ponieważ w badaniu metodą analityczna możliwe jest operowanie zarówno substratem jaki i produktem. Do obserwacji oraz pomiaru zmian stosuje się metody chemii analitycznej: analizę miareczkową, kolorymetryczną, spektrofotometryczną, elektroforetyczna i inne.

Jak już wspomniano najbradziej popularne są metody oparte na pomiarach absorpcji światła (metody spektrofotometryczne). Zazwyczaj pomiary wykonuje się przy długości fali w zakresie od 300 do 400 nm. Związane jest to z faktem, że wiele reakcji enzymatycznych przebiega przy udziale koenzymów, dla których maksimum absorpcji przypada przy $\lambda = 340$ nm [2].

Izolowanie i oczyszczanie enzymów przez wysalanie z materiału biologicznego

Jako materiał biologiczny do izolacji enzymu esterazy (PLE) należy wykorzystać wątróbkę wieprzową.

Wykonanie:
Do zlewki o pojemności 150 ml należy odważyć 50g wątróbki wieprzowej. Całą próbkę drobno pokroić i zmielić w młynku z dodatkiem 100 ml schłodzonego acetonu. Mielenie prowadzić przez 1 minutę. Następnie, zawiesinę przesączyć na lejku ze spiekiem, przesącz odrzucić a pozostały

brązowy osad ponownie mielić (250 obr/s) z dodatkiem 50 ml schłodzonego acetonu (przez 1 min). Przesączyć, a otrzymany przesącz odrzucić, po czym dodać 3 porcje schłodzonego acetonu (150 ml), całość ponownie zmielić. Ponownie próbkę przesączyć (przesącz należy odrzucić), a otrzymany osad zważyć i zastosować jako źródło esterazy (PLE) w preparacie surowym [4].

Oczyszczanie enzymów z zastosowaniem wysalania

W metodzie tej, do probówki wirówkowej należy odważyć ok. 400 mg surowego preparatu enzymatycznego (wątróbka wieprzowa- źródo enzymu). Następnie, do próbki dodać 5 ml buforu fosforanowego (bufor o pH 7,2), a całość dokładnie mieszać przez ok. 1 minutę. Tak przygotowaną próbke trzeba umieścić w łaźni ultradźwiękowej na 5 minut, po czym otrzymaną zawiesinę odwirować w wirówce (8000 obr/min, 10 minut, w temp. 0 st.C). Otrzymany po wirowaniu supernatant przelać do drugiej probówki wirówkowej- paiętać by odczytać przelaną objętość supernatantu! Całość próbki inkubować w łaźni lodowej, po czym dodać do niej (małymi porcjami) taką ilość nasyconego roztworu siarczanu (VI) amonu, by powstały roztwór był wysycony w 80% solą. Należy pamiętać, że rozpuszczalność siarczanu (VI) amonu w wodzie o temp. 20 st.C wynosi 760 g/l- dane uwzględnić podczas wysycania roztworu. Próbkę pozostawić w łaźni lodowej na 1 godzinę- od czasu do czasu mieszając. Po inkubacji próbkę odwirować, a powstały po wirowaniu osad należy traktować jako źródło enzymu (w preparacie oczyszczonym) [4].

Fruktohydrolaza β-D-fruktofuranozydów - inwertaza

Inwertaza (zwana także β-fruktozydazą lub sacharazą) należy do enzymów, które katalizują hydrolizę wiązania fruktofuranozydowego, prowadząc tym samym do rozpadu sacharozy na cząsteczki glukozy i fruktozy.Proces hydrolizy sacharozy określa się zjawiskiem inwersji. Dzięki temu zjawisku enzym otrzymał także nazwę inwertazy. Inwertaza wykazuje optymalne działanie przy pH około 4,7. Wzrost pH do ok. 10 powoduje całkowitą inaktywację tego enzymu [2]. Aktywność enzymu może być mierzona za pomocą tzw. metody redukcyjnej , co związane jest z faktem, że w miarę postępowania hydrolizy sacharozy dochodzi do wzrostu cukrów redukujących. Jako pierwszy jednostopniową metodę izolacji inwertazy opisał Paul Melius (1971). Enzym inwertaza występuje głównie w komórkach roślinnych, zaś najłatwiej izoluje się go z komórek drożdży. Zarówno u roślin jak i u drożdży inwertaza występuje w różnych izoformach (Carlson and Botstein, 1982) [6].

Izolacja inwertazy z drożdży ma kilka zalet:

- po pierwsze, materiał wyjściowy - drożdże piekarnicze są tanie i łatwo dostępne
- enzym łatwo wydobywa się z przestrzeni periplazmatycznej komórek (nocna autoliza z użyciem 0,10M roztworu wodorowęglanu sodu prowadzona w temperaturze 35 st.C- procedura pierwotnie opisana przez P.Melius)
- wysoka stabilność enzymu (praktycznie nie mierzalną utrate aktywności enzymu obserwuje sie po upływie 5 tygodni przechowywania w temperaturze 4 st.C) [1], [2], [5], [8].

U ludzi inwertaza występuje na wewnętrznej powierzchni komórek nabłonka jelita cienkiego, ponadto spotykana jest także u pszczół (a dokładniej w slinie pszczół), gdzie uczestniczy w przetwarzaniu cukru pochodzącego z nektaru kwiatowego do cukrów prostych.To właśnie dzięki takim jej właściwościom możliwe jest wytwarzanie miodu. Ponadto, inwertaza znalazła także zastosowanie w przemyśle, a dokładniej w produkcji czekoladek z płynnym nadzieniem (umożliwia to rozkład sacharozy do monocukrów) [9].

Różne metody otrzymywania inwertazy z komórek drożdżowych (drożdże piekarskie)

Metoda I

Wykonanie:
Pierwszym etapem izolacji inwertazy z drożdży jest rozbicie komórek. W tym celu drożdże poddaje się ucieraniu z piaskiem, a następnie ekstrakcji białek z wodą. Wytrącenie enzymu przeprowadza się przy użyciu acetonu, a cały proces prowadzi się w niskiej temperaturze, co zabezpiecza przed denaturacją:

- należy odważyć 5g drożdży, rozetrzeć je w moździerzu z dodatkiem piasku. Następnie do rozcieranej próbki dodać około 100 ml wody, po czym ponownie dokładnie rozcierać. Po upływie 60 minut, próbkę należy odwirować. Po wirowaniu w supernatancie będzie znajdować się uwolniony enzym - inwertaza.

Metoda II

Kolejna metoda otrzymywania inwertazy z drożdży jest bardzo podobna do tej tradycyjnej (opisanej powyżej) z wyjątkiem jednego etapu, gdzie stosuje się aceton:

- 5g drożdży należy roztrzeć w moździerzu z dodatkiem piasku i ok. 50 ml wody- po dodaniu wody ponwnie całość próbki dobrze rozetrzeć. Po 60 minutach próbkę dokładnie odwirować, a powstały w trakcie wirowania supernatant przenieść do 5-krotnej objętości acetonu (tj. 250 ml), który oziębiony jest do temperatury ok. 4 - 8 st.C. Wytrącony osad rozpuścić w 20 ml wody, po czym konieczne jest jego przesączenie. Tak otrzymany przesącz zawiera inwertazę- można go przechowywać w lodówce przez kilka tygodni [2].

Metoda III

1. w moździerzu rozetrzeć 4g drożdży z dodatkiem 8 g piasku. Próbkę rozcierać 5 minut, po czym dodać ok. 20 ml wody (całośc ponownie dokładnie rozetrzeć). Odwirować (5000 obr/min, 10 min, w temperaturze 20 st.C).
2. objętość otrzymanego supernatantu zmierzyć cylindrem miarowym, dodać 5-krotną objętość acetonu, a całość przelać do butelki z tworzywa sztucznego. Całą zawartość dokładnie wymieszać przez intensywne wytrząsanie (ok. 10 sekund).
3. wymieszaną zawartość butelki przelać do zlewki- poczekać do momentu wytrącenia się osadu (ok. 3 minuty). Próbkę odwirować (2000 obr/min, 2 min, w temp. 20 st.C).
4. otrzymnay supernatant (aceton) zlać, a do falkonów z osadem dodać po 3 ml wody destylowanej, po czym ponownie odwirować (5000 obr/min, 10 min, w temp. 20 st.C) [10].

Metoda IV

Ze względu na fakt, że inwertaza jest wewnątrzkomórkowym enzymem, który nie dyfunduje przez błonę komórkową, można go wydobyć z komórek przez ekstrakcję. Tak więc, ok. 10 g drożdży prasowanych należy dobrze wymieszać z piaskiem (przez ok. 10-15 minut) w celu zniszczenia ściany komórkowej. Do próbki dodać 30 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml toluenu (toluen dodawany jest jako środek antyseptyczny- odkażający). Próbkę inkubuje się następnie przez 2 godziny w temperaturze 37 st.C (w celu autolizy komórek, które nie zostały zniszczone). Po inkubacji całość należy odwirować (4000 rpm, 20 minut). Otrzymany po wirowaniu roztwór będzie zawierał aktywną inwertazę i może być przechowywany w lodówce przez 3 do 4 dni [7].

Tamio Mase i wsp. (2009) przeprowadzili izolację inwertazy z komórek drożdżowych (Pseudozyma sp.)- była to izolacja 4- etapowa. W wyniku doświadczeń ustalili, że wyizolowany enzym jest stabilny w temperaturze ok. 40 st.C i pH=5.0. Ponadto, enzym wykazywał stabilność w zakresie pH od 3 do 8 poniżej 50 st.C. Na podstawie otrzymanych przez badaczy wyników stwierdzono, że produkowana przez Pseudozymas sp. I-8 inwertaza jest wyjatkowym enzymem. Została ona zastosowana w procesie produkcji chleba, dzięki czemu zauważono efekty jej działania: dodanie inwertazy do produkcji spowodowało poprawę objętości wytwarzanych bochenków chleba, a także wzrost miękkości chleba [3].

Do badań użyto szczepu Pseudozyma I-8, który został świeżo wyizolowany i zaszczepiony na skosie agarowym (pH=6.0) zawierającym: 1,6% agar, 2% ekstrakt drożdżowy, 1% glukozę oraz 2% polipepton S.

Przykładowe warunki hodowli komórek drożdżowych do izolacji inwertazy:

Kolonie Pseudozyma I-8 pobrać i inokulować (zaszczepić) do 100 ml butelek, zawierających 20% medium (całość wytrząsać). Skład medium (pożywki): 1% skrobia rozpuszczalna, 1% glukoza, 1% sacharoza, 0,1% K2HPO4 , 0,05%MgSO4•7H2O, 1% ekstrakt drożdżowy i 1% polipepton (pH=6.0). Po 20-godzinnej inkubacji w 25 st.C, 40 ml hodowli należy zaszczepić do 3L pojemnika fermentacyjnego zawierającego 2L powyższej pożywki (medium). Taką hodowle należy prowadzić w 25 st.C przez 72 godziny (z mieszaniem przy 350rpm i z napowietrzaniem 1,5L / minutę). Oczyszczanie inwertazy prowadzić w 5 st.C [3].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1].Timerman A.P., Fenrick A.M., Zamis T.M., 2009. The Isolation of Invertase from Baker's Yeast: A Four-Part Exercise in Protein Purification and Characterization. www.JCE.DivCHED.org, Vol. 86 No. 3 March 2009 , Journal of Chemical Education

[2].Kłyszejko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 471,476, 478, 480-481, 493-494

[3]. Mase T.,Hirose E., Shimizu K., Uchikawa E., 2009. Isolation, Characterization and a Application of Invertase from Pseudozyma sp. I-8. □□□□□□□□□□□ □ 40 □□□□□□□□2009

[4].Grec M., Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Chemia Bioorganiczna i Bionieorganiczna Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna. Badanie aktywności enzymów bezpośrednio po otrzymaniu z materiału biologicznego. Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna" współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. http://www.chemiabioorganiczna.polsl.pl/studenci/materialystudenci/Badanie%20aktywnosci.pdf

[5]. Rehm H.J., Reed G., Puhler A., Stadler P., 1998. Biotechnology, Second Completely Revised Edition.V.8a. Biotransformations I, edited by Kelly D.R. s. 363-365, http://pl.scribd.com/doc/53545724/Biotechnology-Vol-08a-Bio-Transformation-2nd-Ed

[6]. Sturm A., 1999. Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.121.1.1 Plant Physiology September 1999 vol. 121 no. 1 1-8, http://www.plantphysiol.org/content/121/1/1.full

[7].DEZSI C.K., 2011. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY Vol. XV (2011), no.2 11 OPTIMIZATION OF INVERTASE PRODUCTION BY YEAST STRAINS FROM THE GENUS

SACCHAROMYCES. http://saiapm.ulbsibiu.ro/rom/cercetare/ACTA_E/AUCFT_2011_II_11_18.pdf
[8].http://agrobiol.sggw.waw.pl/biochemia/media/%20%C4%87w_1_Inwertaza.pdf
[9]. http://www.chem.uw.edu.pl/people/AMyslinski/Litwin/ins_29_30.pdf
[10].http://cbimo.zut.edu.pl/download/dydaktyka/enzymologia_-_ii_st_i__i_semestr/enzymologia_-_cwiczenia/C%C2%86wiczenie%206%20-%20Inwertaza.pdf
[11].Hames D.B, Hooper N.M, 2007. Biochemia-krótkie wykłady. Wydanie II, Wydawnictwo Naukowe PAN 2007, s. 81-85
[12]. Szutowicz A., Raszei-Szpecht A., 2009. Diagnostyka laboratoryjna. Tom I.Gdański Uniwersytet Medyczny, Zlecenie KW/224/09.Recenzent prof. dr hab.Wiesława Łysiak-Szydłowska, Gdańsk 2009. S.54-55
[13]. Stryer L, 2003. Biochemia. Przekład zbiorowy pod redakcją: Augustyniak J, Michejda J, z czwartego wydania amerykańskiego. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003, s. 199-200

http://laboratoria.net/artykul/19764.html
Informacje dnia: Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób

Partnerzy