

MICROENCAPSULACION DE GLUCOSA OXIDASA

M. Borrajero Montejo, R.B. Aisina y C. Pascual Marqui

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba y Facultad de Química, Universidad Estatal Lomonosov, Moscú, URSS

Recibido: 11 de septiembre de 1989

Recibido: 24 de enero de 1990

ABSTRACT. A method for microencapsulation of glucose-oxidase in polycarbonate membranes and polyethylenimine as protective filler is described. A study of the kinetic parameters K_m , $V_{m\max}$, thermostability, effect of the protective filler and stability of the encapsulated enzyme was made. The glucose-oxidase microencapsulated presents a greater thermal stability than the free enzyme.

RESUMEN. En el presente trabajo se describe un método de microencapsulación de glucosa-oxidasa en membranas de policarbonato (polímero recubridor) y polietilénimina como sustancia de relleno. Se estudiaron los parámetros cinéticos de K_m , $V_{m\max}$, termoestabilidad, efecto de la sustancia empleada como relleno y estabilidad en función del tiempo. Las preparaciones de microcápsulas enzimáticas presentan una mayor estabilidad térmica que la enzima no encapsulada.

INTRODUCCION

Las técnicas de inmovilización enzimática se han desarrollado a tal punto que prácticamente cualquier enzima o célula puede ser inmovilizada con elevada eficiencia catalítica. Al pasar al estado inmovilizado, las enzimas se convierten de moléculas solubles en medio acuoso a moléculas insolubles. Esto puede determinar cambios en sus propiedades cinéticas como afinidad por el sustrato, pH óptimo, actividad catalítica, afinidad por inhibidores, termoestabilidad, etc., que pueden ser ventajosas desde el punto de vista tecnológico pudiendo ser aprovechadas con vistas a su aplicación práctica en el campo de la Biología, la Medicina y en procesos industriales.¹

Actualmente, los métodos de inmovilización se enfocan hacia el desarrollo de estrategias racionales que permitan lograr estabilización de preparaciones enzimáticas y resistencia a inactivación térmica. Entre las técnicas que generalmente se utilizan, se encuentran, la unión covalente de la enzima a soportes sólidos,² se entrecruzamiento con reactivos bifuncionales,³ atrapamiento de las moléculas de enzima en geles poliméricos⁴ y encapsulación.⁵⁻¹⁰

Los métodos de microencapsulación son especialmente útiles en Medicina⁶⁻⁸ por su aplicación en la terapéutica y en el análisis.

En el presente trabajo se emplea el método de microencapsulación de glucosa-oxidasa. Este método consiste en recubrir la enzima con una membrana polimérica impermeable a macromoléculas (enzima) y permeable a sustancias de bajo peso molecular. Los resultados indican que las preparaciones de microcápsulas presentan mayor estabilidad térmica que la enzima no inmovilizada.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de microcápsulas de glucosa-oxidasa. La solución de glucosa-oxidasa (Boehringer Mannheim, 12 U/mg) se prepara a una concentración de 5 mg/mL en polietilénimina 5 % en tampón Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0 (fase acuosa W1).⁹

Como sustancia de relleno se emplea polietilénimina 5 % en tampón Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0.

Como emulsificador se utiliza alcohol polivinílico al 2 % en tampón Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0 (fase acuosa W2).

El polímero para la formación de la pared semipermeable de las microcápsulas es policarbonato al 5 ó 7 % en CH_2Cl_2 (fase orgánica O).

Para realizar la microencapsulación se añaden 3 mL de la solución de enzima sobre 15 mL de policarbonato 5 ó 7 % con agitación a 650 r/min. La agitación se realiza en un beaker de 100 mL y se emplea como agitador un alambre de acero inoxidable de 2 mm de diámetro, en forma de triángulo en su extremo inferior, con 3 cm de longitud a cada lado. A continuación se añaden 60 mL de alcohol polivinílico al 2 % y se mantiene en agitación 2 h hasta lograr la microencapsulación. Una vez completada ésta, se realizan

tres lavados por centrifugación (1 000 g 15 min) y las microcápsulas se resuspenden en 30 mL de tampón Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,0 mertiolate 0,01 %.

Medición de actividad de glucosa-oxidasa. Para la medición de la actividad se utiliza como sustrato glucosa y se emplea un sistema acoplado a peroxidasa y o-dianisidina. El peróxido formado por acción de la glucosa-oxidasa reacciona con la o-dianisidina en presencia de peroxidasa, produciendo un compuesto coloreado que absorbe luz a 546 nm, una vez detenida la reacción con ácido sulfúrico 10 mol/L.

La mezcla de reacción está compuesta por 2 mL de tampón Tris-HCl 0,5 mol/L, pH 7,0 que contienen 10 U de peroxidasa, 60 μ L de glucosa 1 mol/L y 20 μ L de solución saturada de o-dianisidina en metanol. A la mezcla de reacción se añaden 300 μ L de suspensión de microcápsulas y 100 μ L de H_2SO_4 5 mol/L para detener la reacción. Se mide la absorbancia a 546 nm.

RESULTADOS Y DISCUSION

La velocidad de reacción de glucosa-oxidasa microencapsulada es lineal en 30 min (Fig. 1) y presenta una actividad específica de 0,36 μ mol/min/g de microcápsulas⁻¹. Los resultados obtenidos indican que el rendimiento es similar a lo que se reporta en la literatura para este tipo de inmovilización.^{9,10}

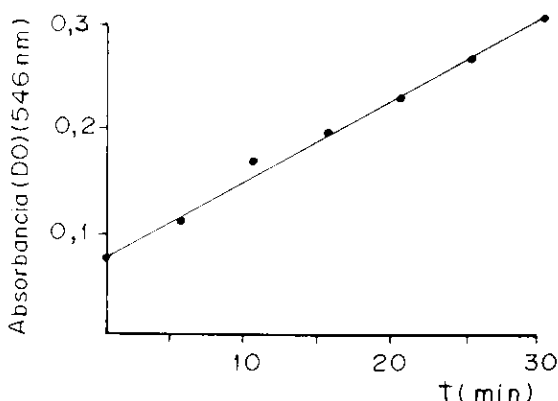


Fig. 1. Velocidad de reacción de glucosa-oxidasa microencapsulada. Se utiliza una preparación de microcápsulas de polímero al 5 % sin polietilénimina

La velocidad de la reacción catalizada por la enzima encapsulada depende tanto de la concentración de la enzima como de la permeabilidad de la membrana. A su vez la permeabilidad depende de varios factores como son el grosor, tamaño de poro, la composición química y el tamaño de la sustancia a difundir a través de la membrana. El grosor de la cápsula es un factor que se puede controlar a través de la concentración del polímero recubridor. A

mayor concentración se obtienen cápsulas de mayor grosor⁸ y con menor velocidad de difusión de sustratos y productos. Esto puede determinar cambios en el comportamiento cinético.

Con el objetivo de conocer el comportamiento cinético de las microcápsulas, se realizó una curva de velocidad vs concentración de sustrato para dos preparaciones de microcápsulas, confeccionadas con dos concentraciones distintas del polímero recubridor (Fig. 2).

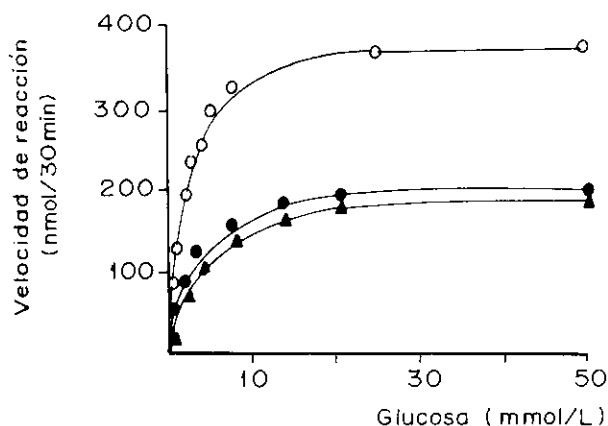


Fig. 2. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato para distintas preparaciones de glucosa-oxidasa.

Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 5 % con polietilenimina; Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 7 % con polietilenimina; Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 5 % sin polietilenimina

A partir de estos resultados y de los obtenidos con la enzima nativa, se determinaron los valores de la constante de Michaelis (K_m) y velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x.}$) mediante la transformada de Eisenthal y Cornish-Bowden.¹¹

Los resultados de la Tabla I indican que las microcápsulas enzimáticas presentan un aumento de la K_m aparente con respecto a la enzima nativa, mientras que el aumento de la concentración del polímero de 5 a 7 % provoca muy poco aumento de la K_m aparente. Como se observa, el valor de $V_{m\acute{a}x.}$ de las dos preparaciones es el mismo.

TABLA I

Valores de K_m y $V_{m\acute{a}x.}$ para enzima microencapsulada y enzima libre

Preparación enzimática	$V_{m\acute{a}x.}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$)	K_m (mmol/L)
Microcápsulas 5 % con polietilenimina	0,19	1,5
Microcápsulas 7 % con polietilenimina	0,19	2,0
Microcápsulas 5 % sin polietilenimina	0,36	1,5
Enzima no encapsulada	1,8 ^a	0,9

^a $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de enzima

Con el objetivo de conocer el efecto de la sustancia empleada como relleno sobre los parámetros cinéticos, se determinó el valor de K_m de microcápsulas preparadas con polímero 5 % sin polietilenimina (Fig. 2, Tabla I). Los resultados demuestran que dicha sustancia no influye sobre la K_m aparente, pero sí sobre la $V_{m\acute{a}x.}$

Uno de los objetivos importantes de los métodos de inmovilización es lograr preparaciones que sean más termoestables que la enzima nativa. Los estudios de estabilidad térmica demuestran que las preparaciones de microcápsulas son mucho más estables que la enzima nativa a 60 °C (Fig. 3).

Por otra parte, las suspensiones de microcápsulas presentan el 85 % de su actividad después de 30 d de su incubación a 28 °C y el 55 % de su actividad después de incubación 60 d a 4 °C (Tabla II).

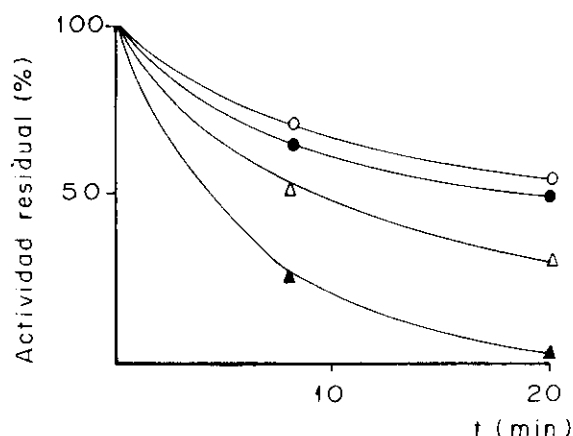


Fig. 3. Estabilidad térmica de distintas preparaciones de glucosa-oxidasa. Se toma como 100 % la actividad que presenta cada preparación inmediatamente antes de ser incubada a 60 °C. Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 5 % con polietilenimina; Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 7 % con polietilenimina; Glucosa-oxidasa en microcápsulas de policarbonato al 5 % sin polietilenimina; Glucosa-oxidasa no encapsulada

TABLA II

Estabilidad de glucosa-oxidasa microencapsulada

Tipo de microcápsula	Actividad enzimática después de la incubación 30 d a 28 °C	60 d a 4 °C (%)
Microcápsulas al 5 % de polímero con relleno	85	55
Microcápsulas al 7 % de polímero con relleno	85	55
Microcápsulas al 5 % de polímero sin relleno	78	30

En estos resultados se observa el efecto favorecedor de la sustancia de relleno en función del tiempo y la temperatura.

CONCLUSIONES

La metodología empleada permitió obtener microcápsulas enzimáticas con actividad apreciable. Estas microcápsulas presentan mayor durabilidad en función del tiempo y la temperatura, cualidades que pueden ser aprovechadas para su empleo en diferentes campos de la investigación, la práctica médica, procesos industriales y otros.

BIBLIOGRAFIA

1. Klibanov A.M. *Science*, **219**, 722, 1984.
2. Sternberg R., Brinda D.S., Wilson G.S. and Thévenot D.R. *Analyt. Chem.*, **60**, 2 781, 1988.
3. Al-Hitti I.K., Moody G.J. and Thomas J.D.R. *Analyst*, **109**, 1 205, 1984.
4. Lange M.A. and Chambers J.Q. *Analyt. Chem. Acta*, **175**, 89, 1985.
5. Komori T., Muramatsu N. and Kondo T. *Appl. Biochem. Biotech.* **14**, 29, 1987.
6. Levi M.C. and Guérin D. *Pharm. Acta Helv.*, **62**, 236, 1987.
7. Maharaj F. and Narin J.C. *J. Pharmacol. Sci.*, **73**, 39, 1984.
8. Aisina R.B., Demina N.B. and Kazanskaya N.F. *Pharmacol. Chem J.* **12**, 1 486, 1984.
9. Miura Y., Miyamoto K., Fujii T., Nakamatsu N. and Okazaki M. *Immobilized Enzyme Technology* Ed. H.H. Weetall and S. Suzuki. New York, London, Plenum Press, 1975.
10. Lukasheva E.V., Aisina R.B., Gracheva I.I., Kazanskaya N.F., Berezin I.V. *Biokhimiya*, **42**, 2 013, 1977.
11. Eisenthal R. and Cornish-Bowden A. *Biochem. J.* **139**, 715, 1974.