



Mikrokapsułkowanie białek – metody i zastosowanie

Anna Piasecka¹, Kamila Goderska²

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

² Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Protein microencapsulation – methods and application

Summary

Biomaterials extracted from natural environment may cause several serious problems due to their low stability. More efficient and safe procedures of their stabilization are still demanded to meet the industry requirements. Microencapsulation is one of the possible methods to prolong the action time of active compounds.

This paper reports the techniques for preparing microcapsules and their applications with reference to extremely troublesome materials such as native proteins. Special attention is paid to current achievements in microencapsulation and perspectives for the next years, and advantages of this technique. The technology enables reactive or sensitive biomaterials such as enzymes to be turned into stable ingredients. With carefully controlled and fine-tuned release capabilities, microencapsulation is no longer only an added value technique, but the source of totally new systems with matchless properties.

Key words:

microencapsulation, enzyme, stabilization of biomaterials.

Adres do korespondencji

Anna Piasecka,
Instytut Genetyki Roślin,
Polska Akademia Nauk,
ul. Strzeszyńska 34,
60-479 Poznań;
e-mail: akar@igr.poznan

1. Wstęp

Białka od wieków stosowane były w różnych dziedzinach działalności człowieka, m.in. w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, skórzanym czy chemicznym. Wykorzystuje się je jako biokatalizatory, selektywne adsorbenty w procesach oczyszczania, w analityce chemicznej, medycznej, a także jako terapeutyki (1,2).

W czasie procesu technologicznego i magazynowania na białka może działać wiele czynników takich jak: temperatura, pH, obecność aktywatorów lub inhibitorów, które ograniczają lub zmieniają ich pożądane cechy (3). Biostabilizacja jest obecnie bardziej sztuką niż nauką osiąganą dla każdego białka metodą prób i błędów. Spośród licznych technik wydłużania okresu trwałości biomateriałów trudno znaleźć taką, która byłaby jednocześnie tania, bezpieczna i prosta. Jedną z nich jest kapsułkowanie – otaczanie określonych cząstek ściankami uformowanymi z jednej lub kilku substancji okrywających (4). Otrzymuje się dzięki temu wieloskładnikowe układy o specjalnych, nowych i pożądanych właściwościach (5).

Mikrokapsułkowanie oferuje zwiększenie selektywności, możliwość koimmobilizacji kilku składników jednocześnie oraz kontrolowany sposób połączenia z substratem. Odgródzenie substancji aktywnych od środowiska zewnętrznego sprzyja zwiększeniu odporności na działanie czynników denaturujących, a często także korzystnie zmienia wartość optymalnego pH. Mikroskopijne wymiary umożliwiają zbudowanie ogromnej powierzchni roboczej. Ponadto proces ten zabezpiecza białka przed dezaktywacją, samoagregacją i flokulacją (6). Opracowano szereg metod mikrokapsułkowania białek. Należy jednak pamiętać, że każda z nich może zostać poddana licznym modyfikacjom, co zwiększa różnorodność oraz zakres wykorzystania.

2. Mikrokapsułkowanie przy użyciu ekstruzji

W metodzie tej zawiesina komponentów kapsułki najpierw zostaje poddana rozproszeniu na mikrokropelki (atomizacji), a następnie wkraplana do pojemnika z substancją, w której materiał ścianki ulega zestaleniu. Powstaje sieć przestrzenna polimeru zamykająca w swej strukturze aktywne składniki (7).

Warunkiem powstania mikrokapsulek jest odpowiedni stopień dyspersji składników rdzenia oraz ścianki. Stosuje się różne sposoby atomizacji: rozpylanie za pomocą wirujących dysz, ultradźwięków, elektrorozpraszania oraz mechanicznego cięcia strumienia wody (ang. *jet cutting*).

Ekstruzja wykorzystująca rozpylanie roztworu na wirujących dyszach ze względu na wysokie ciśnienie homogenizacyjne często powoduje denaturację białek. Uzyskane kapsułki nie mają jednakowych wymiarów, a ich średnica jest stosunkowo duża: 500-1000 μm . Dysze ultradźwiękowe eliminują te problemy, umożliwiając tworzenie mikrokapsulek białkowych w łagodniejszych warunkach. Otrzymuje się sferyczne cząstki o wyrównanych cechach przeznaczone do długiego przechowywania (8). Są one bardziej odporne na niekorzystne czynniki zewnętrzne niż te otrzymane przez konwencjonalne wkraplanie. Dysze ultradźwiękowe mają duży potencjał aplikacyjny w odniesieniu do technologii stabilnych systemów terapeutycznych. Przykładem może być lizozym zamknięty w membranie z PLGA (kopolimer kwasu DL-polimlekowego i kwasu glikolowego) (9). Ta nowa technika wymaga jednak uproszczenia aby można było zastosować ją na skalę przemysłową.

Poprzez elektrozpraszenie możliwe jest otrzymanie nanometrowych cząsteczek o doskonałym stopniu dyspersji. Atutem tej metody są również jednoetapowość oraz łagodne warunki operacji umożliwiające pracę z wrażliwymi biomateriałami.

Do kapilary, przez którą przepływa ciecz, przyłożone jest wysokie napięcie. To powoduje powstawanie zdeformowanego, stożkowego menisku kropli wypływającej z przewodu. Po przekroczeniu napięcia powierzchniowego kropla rozpada się na szereg nanocząstek niosących ze sobą określony ładunek elektrostatyczny. Dzięki wzajemnemu odpychaniu naładowanych molekuł uzyskuje się układ monodispersyjny i zapobiega koalescencji – częstemu problemowi przy mikrokapsułkowaniu (10). Otrzymuje się z dużą wydajnością (do 90%) kuliste kapsułki o gładkiej powierzchni.

Elektrozpraszenie wykorzystywane jest głównie w spektrometrii masowej do jonizacji płynów (11). Prace nad zastosowaniem do terapeutyków białkowych trwają od 1997 r. Jako substancje ścianki wykorzystano z powodzeniem biodegradowalne i nietoksyczne: PLGA, chitosan oraz kompleks chitosanu i alginianu. W badaniach membran o takim składzie mikrokapsułkujące albuminę (BSA) wykazano, że układy te mają ograniczoną stabilność w pH powyżej 7,2 oraz w roztworach o wysokim stężeniu soli metali jednowartościowych oraz grup anionowych (12). Właściwości takie charakteryzują bufora stosowane w biotechnologii, jak również układy buforowe żywych organizmów. Dlatego nie ma jak dotąd przełożenia tej techniki na skalę produkcyjną.

Jet cutter jest prostym i wydajnym narzędziem do otrzymywania monodispersyjnych mikrokapsulek z płynów o lepkości przekraczającej kilka tysięcy mPa·s (13). Laminarny strumień cieczy płynącej z dużą prędkością jest przecinany przez wirujące przewody na cylindryczne segmenty. Dzięki napięciu powierzchniowemu formują się z nich sferyczne krople.

Mikrocząsteczki otrzymane jedną z wymienionych metod mają postać płynną i nietrwałą. Aby zestalić materiał tworzący ścianki wykorzystuje się ochładzanie w zimnym powietrzu lub wodzie (otoczki woskowe), odparowanie lub suszenie rozpuszczalnika w strumieniu ciepłego powietrza, hydrożelowanie oraz koacerwację międzycząsteczkową (14).

W mikrokapsułkowaniu hydrożelowym otoczka powstaje przez wkraplanie anionowego polimeru do roztworu kationu, gdzie następuje tworzenie kompleksów polielektrolitowych. Mają one charakter hydrożeli i przeznaczone są do immobilizacji rozmaitych materiałów pochodzenia biologicznego (15,16). Wykorzystuje się wielkocząsteczkowe polimery takie jak siarczan celulozy, alginian oraz syntetyczne związki zawierające czwartorzędowe grupy aminowe o ciężarze nie mniejszym niż 40 kDa. W odniesieniu do enzymów, nawet wyjątkowo niestabilnych białek rekombinowanych, z dużą wydajnością stosuje się kopolimeryzację chitozanu i alginianu (17).

Ekstruzja jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod mikrokapsułkowania enzymów. Jako matriks służą tworzywa sztuczne lub zawierające skrobię i tłuszcze.

Przykładem są stabilne preparaty katepsyny B otoczkowanej w sieci CM-celulozy oraz Ca^{2+} -alginianu (3).

Dzięki ograniczonej dyfuzji gazów przez matrycę systemy tworzone metodą ekstruzji mają długi okres przechowywania (18). Niestety, stopień upakowania substancji rdzenia jest niewielki. Ogranicznikiem jest również liczba materiałów mogących służyć jako ściana kapsułki.

3. Mikrokapsułkowanie przy użyciu technik rozpyłowych

Najstarszą techniką mikrokapsułkowania jest suszenie rozpyłowe. Wieże rozpyłowe są stosowane od lat 30. XX w. do mikrokapsułkowania substancji tłuszczowych lub rozpuszczalnych w tłuszczach. Emulsje lub zawiesiny rozpylane są na dyszach obrotowych w 160-210°C, co umożliwia szybkie odparowanie rozpuszczalnika i powstanie otoczki na powierzchni kropli (19). Trwają prace badawcze nad zastosowaniem tej łatwej i taniej metody do kapsułkowania termolabilnych białek. Dzięki kompleksowaniu z glikolem polietylenowym możliwe jest suszenie rozpyłowe biomateriałów hydrofobowych (20), a chitosan przydatny okazał się w tworzeniu systemów kontrolowanego uwalniania terapeutyków (21).

Mikrokapsułki otrzymane przez suszenie rozpyłowe są kuliste, porowate i dość dobrze rozpuszczalne w wodzie. Rozmiar waha się w szerokich granicach od 10 μm aż do 2 mm i zależy od parametrów procesu i materiałów kapsułkowanych. Ważna jest również wytrzymałość mechaniczna, która zależy od stężenia białka oraz polimeru i jego zdolności tworzenia ścianki (19).

Większe zastosowanie w mikrokapsułkowaniu substancji labilnych termicznie ma zestalenie rozpyłowe. Metoda ta polega na zawieszeniu cząsteczek rdzenia w stopionym tworzywie ścianki o niskiej temperaturze topnienia (32-42°C), a następnie rozpyleniu tej mieszaniny w zimnym powietrzu, przez co uzyskuje się szybkie utwardzenie ścianki (7). Proces ten jest zależny m.in. od szybkości podawania materiału, szybkości obrotu tarczy rozpyłowej i lepkości materiału rozpylonego. Mikrokapsułkowanie wykonywane jest w tradycyjnych suszarkach rozpyłowych. Od procesów wysokotemperaturowych odróżnia je budowa uzyskiwanych cząstek. Substancje aktywne są związane jako agregaty w sieci polimerów nośnikowych. Znaczna ich część jest ulokowana na powierzchni membrany lub wystaje z matriks, mając bezpośredni kontakt z otoczeniem. Takie kapsułki charakteryzują się zdolnością uwalniania całej zawartości w przeciągu kilku minut po zadziałaniu czynnika destabilizującego. Mechanizmy wpływające na proces uwalniania mogą mieć charakter mechaniczny, np. dyfuzja wody do wnętrza kapsułki, uszkodzenie lub chemiczny m.in. zmiana ciśnienia osmotycznego, zmiana rozmiaru, hydrofobowości i gęstości membrany. Wymiary kapsulek z otoczką tłuszczową są jednorodne i wynoszą zwykle od 100 μm do 300 μm , a ich powierzchnia jest nieregularna. Poza tym mikrokapsułkowaniu tą metodą poddaje się głównie związki o charakterze hydrofilowym, np. witaminy z grupy B czy kwas askorbinowy.

Jest to najmniej kosztowna metoda mikrokapsułkowania i dlatego wykorzystywana rutynowo w immobilizacji zarówno nieorganicznych, jak i organicznych tworzyw hydrofilowych, leków, enzymów, substancji lotnych i innych składników funkcjonalnych.

4. Mikrokapsułkowanie fluidyzacyjne

Oparte jest na zjawisku fluidyzacji. Zachodzi w pionowej kolumnie, na dnie której umieszczony jest materiał rdzenia głównie w postaci sproszkowanej (7). Od dołu, przez perforowane dno przepuszcza się ku górze strumień sprężonego gazu. Roztwór polimeru powlekającego może być podawany od dołu lub od góry. Cząsteczki podczas unoszenia się oblepiane są przez substancję ścianki. Jednocześnie zachodzi proces ich suszenia. Aby uniknąć wpływu tlenu na substraty i podłoże, używane są gazy obojętne, np. azot lub dwutlenek węgla. Jest to bardzo wydajna metoda do otrzymywania jednolitych, monowarstwowych kapsulek. Jednocześnie uniwersalność jej stosowania pozwala wytworzyć otoczkę praktycznie dla każdej substancji. Często najpierw stosuje się suszenie lub zestalenie rozpyłowe, a następnie dla zwiększenia trwałości, powleka się fluidyzacyjnie warstwą tłuszczową.

Coraz większą popularność w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym zyskuje technika mikrofluidyzacyjnego otrzymywania nanokapsulek o średnicach 100-500 nm (22). Ze względu na możliwość ograniczenia zawartości wody i pominięcie etapu odparowania rozpuszczalnika zwiększa się wydajność i skraca czas produkcji. Uzyskane systemy są dobrze rozpuszczane w wodzie, a ich trwałość wynosi od 1 do 2 lat.

5. Mikrokapsułkowanie koacerwacyjne

Oparte jest na oddziaływaniach chemicznych koloidów. Początkowo wytwarzany jest układ trójfazowy, przy czym polimerowy materiał ścianki rozpuszczalny jest w dwóch niemieszających się fazach (23). Wprowadzenie do takiego układu hydrofobowych białek w określonych warunkach powoduje otoczenie ich przez cienki film polimeru i wydzielenie drugiej fazy płynnej (koacerwacja). Proces ten może zostać wywołany poprzez: zmianę temperatury, dodanie odpowiedniego rozpuszczalnika, soli nieorganicznych czy też interakcję z niezgodnym polimerem (rozpuszczalnym w odmiennym środowisku). Kolejnym etapem jest zestalenie ścianki następujące w wyniku obniżenia temperatury, zmiany pH lub dodania określonego rozpuszczalnika.

W przemyśle największe zastosowanie znalazła koacerwacja kompleksowa – zestalenie materiału ścianki dzięki oddziaływaniom polielektrolitów o odmiennych ładunkach i tworzeniu przez nie w wodzie płynnej fazy polimeru. Najczęściej wyko-

rzystywany jest zestaw żelatyna/ guma akacyjowa (24). Inne systemy wykorzystują gliadynę, heparynę wraz z żelatyną, karageny i białka soi. Istnieje także możliwość tworzenia wielowarstwowych otoczek w procesie wieloetapowej koacerwacji, w którym dodatkowe warstwy dodawane są w kolejnych pasażach (25). Końcowa grubość warstwy może osiągnąć do 160 μm .

Mikrokapsułkowanie na zasadzie koacerwacji jest stosowane do rozpuszczalnych w wodzie substancji stałych, ciekłych lub zawiesin o wielkości cząsteczek 2-5000 μm i większych. Jest to wydajna metoda ze względu na możliwość otrzymania nawet do 99% substancji aktywnych w rdzeniu. Uwalnianie zawartości następuje pod wpływem stresu mechanicznego lub temperaturowego.

Metoda ta jest szeroko wykorzystywana w przemyśle drukarskim, w produkcji syntetycznych pestycydów, jak również kapsułkowanych bakterii wytwarzających toksyczne dla owadów związki (26). Można ją zaadaptować do immobilizowania enzymów dla przemysłu chemicznego (27). W 1999 r. Millqvist-Fureby i wsp. opisała metodę ATPS (ang. *Aqueous Two Phase System*), wykorzystaną do stabilizacji trypsyny (28).

Główną wadą tej techniki jest konieczność używania katalizatorów do sieciowania przestrzennego (13). Często stosuje się aldehyd glutarowy, toksyczny dla człowieka. Alternatywą jest użycie enzymu – transglutaminazy. Poważnym mankamentem jest także duża lepkość otrzymanych kapsułek i tendencja do aglomeracji. Minimalizowanie tej wady uzyskuje się przez stosowanie wysokich temperatur na etapie tworzenia koacerwatu, co z kolei eliminuje możliwość obróbki termolabilnych białek.

6. Ekstrakcja nadkrytyczna (RESS, ang. *Rapid Expansion of Supercritical Solutions*)

Płyny nadkrytyczne posiadają gęstość cieczy i dyfuzyjność gazów, co czyni je użytecznymi rozpuszczalnikami dla technologii biopolimerów (29). Najpopularniejszym jest dwutlenek węgla. Charakteryzuje się niską temperaturą krytyczną (31,1°C) przy średnich ciśnieniach (73 bary). Poza tym jest niedrogi, bezpieczny w użyciu – nie zostawia toksycznych pozostałości i nie jest palny. Wykorzystuje się również alkanany ($\text{C}_2\text{-C}_4$) oraz tlenek azotu (N_2O). Materiałami ścianki mogą być jedynie nieorganiczne związki rozpuszczalne w płynach nadkrytycznych, np. polidimetylosiloksan (PDMS) (30). Dzięki wysokiej czystości otrzymywanych preparatów, łagodnym warunkom operacji i możliwości modyfikacji polimerów technika RESS znalazła szerokie zastosowanie do przygotowywania systemów docelowego transportu leków, szczególnie w leczeniu inhalacjami zawierającymi białka (31).

Proces mikrokapsułkowania rozpoczyna się wypełnieniem pompy strzykawkowej płynnym dwutlenkiem węgla. W układzie utrzymuje się ciśnienie 74 barów. Sprężony CO_2 jest tłoczony do izolowanej komory niskociśnieniowej, w której jest podgrzewany do 31,1°C do osiągnięcia stanu nadkrytycznego. Następnie do komory

wpuszczana jest mieszanina składników kapsułki, która ulega rozpuszczeniu w płynie nadkrytycznym.

Otwarcie zaworu przed dyszą skutkuje rozprężeniem atmosfery wewnątrz niej, obniżeniem gęstości mieszaniny i gwałtownym spadkiem rozpuszczalności polimeru opłaszczającego (32). Następuje wytrącenie mikrocząstek i formowanie ściany wokół substancji aktywnej. Już przy niewielkim obniżeniu ciśnienia otrzymuje się znakomite rozdrobnienie cząstek.

7. Wytrącanie płynami nadkrytycznymi (SAS, ang. *Supercritical Fluid Antisolvent*)

SAS jest techniką szeroko wykorzystywaną w procesach ciągłych i półkrośowych (7). Odwrotnie niż w RESS, stosuje się do roztworów nierozpuszczalnych w płynie nadkrytycznym, tworzących stabilne układy trójfazowe: rozpuszczalnik – substancje rdzenia – polimer ścianki (33). Nadkrytyczny CO₂ działa tu jako substancja zmniejszająca rozpuszczalność układu. Początkowo jednorodna mieszanina składników kapsułki po dodaniu CO₂ i przeprowadzeniu go w stan nadkrytyczny zmienia swe właściwości fizykochemiczne. Dochodzi do wytrącania składników mikrokapsułki w roztworze płynu nadkrytycznego i formowania mikrocząstek. Duża gęstość w porównaniu z powietrzem i niskie napięcie międzyfazowe nadkrytycznego CO₂ sprawiają, że można uzyskać lepszy stopień dyspersji mikrokapsulek niż w tradycyjnych procesach atomizacyjnych. Technikę tę stosuje się do otrzymania mikrokapsułkowanych leków lub niskocząsteczkowych polimerów takich jak PLGA lub PCL (poli(ε-kaprolakton)) (34). Zakres stosowania jest ograniczony do wytrącania jedynie substancji hydrofilowych.

Modyfikacją techniki SAS jest wytrącanie mikrokapsulek substancjami w stanie blisko punktu krytycznego, nazywanymi gazami stężonymi (DG, ang. *Dense Gas*) (35). Roztwór jest podgrzewany izobarycznie. Następuje wytrącenie pożądaných składników. Następnie dodatkowa porcja stężonego gazu jest dodawana w celu usunięcia obecnego rozpuszczalnika. Skutkiem jest otrzymanie wysoce oczyszczonych mikrocząsteczek. Przykładem hormonu stabilizowanego tą metodą (ang. *GAS, Gas Antisolvent Precipitation*) jest insulina, tworząca kapsułki o średnicy 3 μm, o dużym stopniu upakowania – do 80% masy mikrokapsułki stanowi białko (36).

8. Cząsteczki z roztworu gazu nasyconego (PGSS, ang. *Particles from a Gas-Saturated Solution*)

Zarówno substancje aktywne jak i ścianki nie muszą być rozpuszczalne w płynie nadkrytycznym. Zmieszanie składników kapsułki w płynie nadkrytycznym pod wysokim ciśnieniem powoduje dyfuzję płynu w strukturę polimeru ścianki i jego pęcznienie

nie (37). Następnie podgrzany powyżej temperatury przejścia szklistego polimer ulega upłynnieniu. Obniżenie ciśnienia w czasie rozpylania na dyszach, umożliwia otoczenie rdzenia przez płynny polimer i skurczenie do wyjściowych rozmiarów.

Technika ta jest bardziej wydajna niż RESS i pochłania mniej płynu nadkrytycznego. Znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym do kapsułkowania słodzików oraz enzymów technologicznych (13).

9. Mikrokapsułkowanie w żelujących nanoporowych matrycach

Trwają intensywne badania nad ideą zamykania substancji aktywnych w nanoporowych matrycach (38,39). Opracowana technika wykorzystuje żele krzemionkowe, co odróżnia ją od tradycyjnych procesów żelowania. Pozwala otrzymać ultradrobny proszek w łagodnych warunkach. Wyjściowy materiał ścianki i rdzenia przetwarzany jest w formę zolu w środowisku wodnym lub wodnego roztworu kwasu. Otrzymany następnie żel poddaje się procesowi starzenia oraz suszenia w celu usunięcia rozpuszczalnika. W takim środowisku ruch cząsteczek wody jest znacznie ograniczony. Do tego stopnia, że nie krystalizuje nawet w -190°C , lecz przechodzi w lepłą ciecz, stabilizując białka. Zaletą nanokapsulek jest wzrost termicznej i chemicznej odporności, a także łatwość stosowania, przetwarzania i modulowania właściwości biomateriałów. Eliminowany jest także problem obecności tlenu i związanego z nim utleniania składników. Należy wspomnieć, że proces nie wymaga etapu oczyszczania. Dotychczas szeroko wykorzystuje się nanokapsułki w kremach pielęgnacyjnych, zastosowanie znalazły również w farmacji jako nośniki leków. Trwają prace laboratoryjne nad leczeniem nowotworów z użyciem polimerowych nanokapsulek i nanosfer oraz nanoliposomów (40).

10. Mikrokapsułkowanie z wykorzystaniem liposomów

Składnik kapsułkowany może być zamknięty wewnątrz liposomu lub rozmieszczony między warstwami tłuszczowymi. Lipidy są dogodnym materiałem wykorzystywanym w systemach kontrolowanego uwalniania leków, szczepionek, kosmetyków, a w przemyśle spożywczym enzymów powodujących przyspieszenie dojrzewania sera. Interesujące są badania nad zastąpieniem drogich fosfolipidów wchodzących w skład ścian kapsułki emulsjami na bazie glicerydów (41). Aby przedłużyć działanie białek lub manipulować fizykochemicznymi właściwościami kapsulek należy dobrać odpowiedni skład lipidów. Systemy te są wytrzymałe mechanicznie – można je liofilizować i zamrażać.

W celu uzyskania liposomów o określonych właściwościach stosuje się jedną z kilku metod, m.in. hydratację cienkiego filmu lipidowego, sonifikację, prasę Frencha czy odparowywanie techniką faz odwróconych. Uzyskane cząsteczki mają jednak wysoce niejednorodne rozmiary, dlatego konieczna jest selekcja na odpowied-

nich membranach. Przemysłowcy dodatkowo borykają się z problemem niskiej wydajności, a także trudności z przystosowaniem do produkcji wielkoskalowej (42).

Mikrokapsułkowanie początkowo stosowane jedynie w drukarniach, obecnie stanowi ważną część przemysłu spożywczego, farmaceutycznego oraz chemicznego (13). Ma zastosowanie dla substancji o nanometrowych rozmiarach, np. niektóre leki, związki aromatyczne jak również dla złożonych polimerów białkowych, a także dla całych genów oraz komórek. Najbardziej znanym produktem wytwarzanym na skalę przemysłową od dawna jest bezwęglowa kalka kopiująca, fotowrażliwy papier oraz perfumy i aromaty spożywcze. Większość z nich powstaje techniką koacerwacji kompleksowej oraz pokrewnych technik opartych na oddziaływaniach chemicznych, tj. polimeryzacji *in situ* oraz polikondensacji międzyfazowej. Do kapsułkowania peptydów i białek najlepiej nadają się techniki koacerwacyjne, rozpyłowe oraz ekstrakcji gazem nadkrytycznym (43). Jako materiał ścianki często wykorzystuje się nietoksyczne dla człowieka polimery, tj. kwas polilaktozowy (PLA) czy PLGA.

W najprężniej rozwijającym się rynku mikrokapsułkowania, tj. Stanach Zjednoczonych, liczba patentów od 1995 do 2001 r. wzrosła dwukrotnie i przekroczyła 8000 (44). Najwięcej dotyczyło polimeryzacji, ekstruzji oraz suszenia rozpyłowego. Nadal przeważa rozwój technik mikrokapsułkowania nad nanokapsułkowaniem (liczba patentów mniejsza niż 2000), spośród których największe zainteresowanie, przejawiające się liczbą publikacji, wzbudzają koacerwacja, ekstruzja, fluidyzacja oraz zamykanie w liposomach (7).

Działanie labilnych biopolimerów zależy w dużej mierze od sposobu zabezpieczenia ich struktury w czasie obróbki, przechowywania i transportu. Dotychczasowe technologie mikrokapsułkowania nie są doskonałe. Dlatego trwają dalsze prace nad ulepszaniem już istniejących, a także opracowywaniem zupełnie nowych. Przedstawiono dwie obiecujące koncepcje wytwarzania mikrokapsułek przyszłości.

11. Filmy Langmuira-Blodgett (technika LB)

Większe zastosowanie niż liposomy, zwłaszcza w produkcji żywności, znalazły cyklodekstryny, składające się z 6, 7 lub 8 jednostek glukopiranozowych (odpowiednio α -, β - i γ - cyklodekstryny). Są to związki amfifilowe, które w połączeniu ze zdolnością do formowania ścianek stwarzają obiecującą wizję mikrokapsułek mogących adsorbować do określonej powierzchni (45). Właściwości cyklodekstryn wykorzystuje się powszechnie w wytwarzaniu filmów Langmuira-Blodgett (LB). Są to monomolekularne warstwy aktywnych związków organicznych zaadsorbowanych na stałym podłożu. Tego typu układy tworzą m.in. biosensory, enzymy zaadsorbowane na substracie. Enzymy tworzące filmy LB charakteryzują się bardzo dużą specyficznością i wytrzymałością na niekorzystne warunki otoczenia. Połączenie z mikrokapsułkami cyklodekstranowymi może stanowić stabilny system transportu docelowego białek, np. do komórek w organizmie.

12. Immobilizacja w matrycy z plazmy generowanej laserowo

Plazma (grec. formowalne) jest nazywana czwartym stanem skupienia. W plazmie atomy (lub jony) poruszają się chaotycznie we wszystkich kierunkach i podlegają wzajemnym oddziaływaniom. Ma charakter gazu zjonizowanego, w którym przynajmniej część atomów posiada wolne elektrony. To pozwala przewodzić prąd elektryczny. Przewodność indukuje inne, szczególne właściwości.

Trwają prace badawcze nad stworzeniem membran plazmowych kompatybilnych z biomolekułami (46). W wyniku modyfikacji plazmowej membran z polisulfonu i poli(tlenku fenylenu) otrzymano nowe materiały o doskonałych właściwościach separacyjnych. Obecnie otrzymywane membrany są stosowane nie tylko w ciśnieniowych technikach separacji białek, ale także jako podłoża do immobilizacji enzymów. W przyszłości systemy takie mogą zostać zaadaptowane do technologii kapsułkowania białek (7).

13. Podsumowanie

Mikrokapsułkowanie białek jest przedmiotem zainteresowania wielu gałęzi przemysłu. Systemy kontrolowanego uwalniania zawartości kapsułek przyjęły się w farmacji oraz przemyśle spożywczym. Unieruchamiane enzymy stosuje się w oczyszczalniach ścieków, do celów syntezy chemicznej, a także w środkach codziennego użytku takich jak proszki do prania czy kremy pielęgnacyjne. Przemysł biotechnologiczny upatruje wielkich zysków w prężnie rozwijającym się rynku mikrokapsułkowanych przeciwciał monoklonalnych jako szczepionek.

Mimo postępu technologicznego w produkcji białek mikrokapsułkowanych, prowadzącego do komercjalizacji niektórych produktów, wciąż wiele wad technicznych pozostaje nie rozwiązanych (43). Problemem pozostaje utrzymanie stabilności terapeutyków w systemach kontrolowanego uwalniania, zmienny poziom uwalniania substancji aktywnych oraz duże koszty transferu produkcji ze skali laboratoryjnej do przemysłowej. Ważne jest również złagodzenie warunków reakcji by minimalizować denaturację białek. W przypadku produktów przeznaczonych dla człowieka konieczne jest także wyeliminowanie toksycznych rozpuszczalników. Część przeszkód udaje się przezwyciężyć dzięki badaniom z zakresu chemii polimerów oraz udoskonalaniu technik mikrokapsułkowania. W przyszłości należy spodziewać się wielu nowych rozwiązań technologicznych usprawniających procesy przemysłowe i przynoszących znaczne korzyści ekonomiczne.

Literatura

1. Lakkis J.M., (2007), *Introduction to Encapsulation and Controlled Release in Food Systems*, in: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
2. Turkiewicz M., Makowski K., (2004), *Biotechnologia*, 3(66), 113-128.
3. Sharma S., Mittal A., Gupta V. K., Singh H., (2007), *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 337-342.
4. Arshady R., (1993), *Biomaterials*, 14(1), 5-15.
5. Yoshizawa H., (2004), *Kona*, 22, 23-31.
6. Phadke R. S., (1995), *Biosystem*, 35, 179-182.
7. Gouin S., (2004), *Trends Food Sci. Techno.*, 15, 330-347.
8. Kim B. S., Oh J. M., Kim K. S., Seo K. S., Cho J. S., Khang G., Lee H. B., Park K., Kim M. S., (2009), *Biomaterials*, 30, 902-909.
9. Yeo Y., Park K., (2004), *J. Contr. Rel.*, 100, 379-388.
10. Yixiang X., Milford A. H., (2006), *Int. J. Pharmaceutics*, 320, 30-36.
11. Stobiecki M., Kachlicki P., (2005), *Acta Physiol. Planta*, 27(1), 109-116(8).
12. Baoguo L., Zhang W., Zhongli P., (2006), *Proceedings of the American Society of Agricultural and Biological Engineers International (ASABE)*, 067098, 1-8.
13. Benita S., (2005), *Microencapsulation: methods and industrial applications*, CRC Press, USA.
14. Ma J., Feng P., Ye C., Wang Y., Fan Y., (2001), *Colloid and Polymer Science*, 279(4), 387-392.
15. Bartkowiak A., Brylak W., (2006), *Polimery*, 51, (7-8), 547-554.
16. Nadezda G., Balabushevich N. G., Larionova N. I., (2008), *J. Microencapsul.*, 1464-5246.
17. Azarnia S. H., Lee B., Robert N., Champagne C. P., (2008), *J. Microencapsul.*, 25, 1, 46-58.
18. Champagne C., Fustier P., (2007), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18, 184-190.
19. Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R., (2007), *Food Rese. Int.*, 40, 1107-1121.
20. Mok H., Park T. G., (2008), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70(1), 137-144.
21. Kusonwiriawong C., Pichayakorn W., Lipipun V., Ritthidej G. C., (2009), *Microencapsul.*, 26(2), 111-21.
22. Lee S., Lee L., (2005), *Encyclopedia of Chemical Processing*, CRC Press, 1017.
23. Nihant N., Grandfils C., Jérôme R., Teyssié P., (1995), *J. Contr. Rel.*, 35, 2-3, 117-125.
24. Arneodo C. J. F., (1996), *FR 2732240 A1*.
25. Ijichi K., Yoshizawa H., Uemura Y., Hatate Y., Kawano Y., (1997), *J. Chem. Eng. Japan*, 30, 793-798.
26. Sher H. B., Rodson M., (2002), *U.S. Patent 6,340,653*.
27. Genc L., Demirel M., Güler E., Hegazy N., (1998), *J. Microencapsul.*, 15, 1, 45-53.
28. Millqvist-Fureby A., Malmsten M., Bergenstahl B., (1999), *Int. J. Pharmaceutics*, 188 (2), 243-253.
29. Cottonaro C., Levy A., Rixon M., (2007), *The Supercritical Fluids Research Group*, University of New South Wales.
30. Ghosh S. K., (2006), *Functional coatings by polimer microencapsulation*, Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
31. Hakuta Y., Seino K., Ura H., Adschiri T., Takizawa H., Arai K., (1999), *J. Mater. Chem.*, 9, 2671-2674.
32. Emami J., Hamishehkar H., Najafabadi A. R., Gilani K., Minaiyan M., Mahdavi H., Mirzadeh H., Fakhari A., Nokhodchi A., (2009), *J. Microencapsul.*, 1464-5246, 26, 1, 1-8.
33. Kim J. H., Paxton T. E., Tomasko D. L., (1996), *Biotechnology Progress*, 12, 650-661.
34. Bleich J., Miiller B. W., (1996), *J. Microencapsul.*, 13, 131-139.
35. Dos Santos R., Richard J., Pech B., Thies C., Benoit J. P., (2002), *Int. J. Pharmaceutics*, 242 (1-2), 21, 69-78.
36. Richard J., Dulieu C., (2001), *Patent WO 0112160*.
37. Reverchon E., Volpe M. C., Caputo G., (2003), *Curr. Opin. Sol. Sta. Mat. Sci.*, 7, 4-5, 391-397.
38. Ragoonanan V., Aksan A., (2007), *Transfus Med. Hemother.*, 34 (4), 246-252.
39. Raghavendra C., Mundargi V., Babu R., Rangaswam V., Patel P., Aminabhavi T. M., (2007), *J. Contr. Rel.*, 125(3), 193-209.

40. Kingsley J., Dou H., i in. (2006), *Blood*, 108(8), 2827-2835.
41. Roux D., Degert C., Laversanne R., (1996), FR 2735658 A1.
42. Anjani K., Kailasapathy K., Phillips M., (2007), *Int. Dai. J.*, 17, 79-86.
43. Yeo Y., Baek N., Park K., (2001), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 6, 213-230.
44. www.microencapsulation.swri.org
45. Kawabata Y., Matsumoto M., Nakamura T., (1998), *Thi. Sol. Films*, 159, 353-358.
46. Gancarz I., Pozniak G., Bryjak M., Tylus W., (2002), *Eur. Pol. J.*, 38, 1937-1946.