

ESTABILIZACIÓN DE GLUCOSA OXIDASA CON EL POLÍMERO CARBOXIMETIL CICLODEXTRINA.

MSc. Madyu Matos Trujillo

*Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía Blanca
Km.3, Matanzas, Cuba.*

Resumen.

El uso de las enzimas en la actualidad se ha extendido desde la industria hasta el diagnóstico biomédico, y el control medio ambiental. La transformación covalente de la glucosa oxidasa con el polímero CMC-CD mostró la efectividad de esta estrategia, en el mejoramiento de la estabilidad bajo diferentes condiciones desnaturalizantes. La glicosilación de la enzima redox, con el CMC-CD podría ser una herramienta para elevar la resistencia funcional de este biocatalizador.

Palabras claves: estabilización, enzimas, polímeros.

Introducción

El uso de las enzimas en la actualidad se ha extendido desde la industria hasta el diagnóstico biomédico, y el control medio ambiental. Sin embargo, en cualquier campo de su aplicación, la baja estabilidad conformacional provoca una rápida disminución en la actividad de estos biocatalizadores. Por este motivo, se dedican grandes esfuerzos en el estudio del mejoramiento de esta problemática en muchas enzimas (Hernández, 2007).

La glucosa oxidasa (β -D glucosa-oxidoreductasa, EC 1.1.3.4, GOx) es una flavoproteína que cataliza la oxidación de la β -D glucosa a D glucono-lactona y peróxido de hidrógeno, para lo cual utiliza el oxígeno molecular como aceptor final de electrones (Tsuge, 1982; Zoldak, 2004). Esta enzima es una glicoproteína dimérica, con dos subunidades idénticas, las cuales bajo condiciones desnaturalizantes, se disocian y se libera el dinucleótido de flavina y adenina (FAD), su cofactor catalítico.

Las aplicaciones de esta enzima son muy amplias tanto en la industria de los alimentos (Anastassiadis y col., 2003), como en el diseño de biosensores analíticos para el diagnóstico clínico (Liu y col., 2003; Du y col., 2006; Xue y col., 2006;). La amplia utilización de la GOx favorece el desarrollo de nuevas estrategias para incrementar su estabilidad. Entre las estrategias más efectivas para este propósito, se destacan la modificación covalente de su estructura proteica con polímeros hidrosolubles de baja y alta masa molecular (O' Fágáin, 2003).

La glicosilación de enzimas con CMC-CD ha proporcionado una alta estabilidad a enzimas tales como la α amilasa (Darias y col., 2001), tripsina (Villalonga y col, 2003), superóxido dismutasa, lo cual se le atribuye a numerosos factores tales como las interacciones iónicas-

covalentes y supramoleculares que se establecen entre la proteína y las cadenas del polímero.

Al considerar la amplia utilidad de la glucosa oxidasa, así como el desarrollo de estrategias para incrementar su estabilidad, en el presente trabajo tiene como objetivo realizar una valoración de los principales resultados de la glicosilación covalente de GOx con CMC-CD y su influencia sobre la estructura y las propiedades catalíticas de esta enzima redox.

Aplicaciones de las enzimas

Las enzimas en la actualidad son aplicadas como catalizadores importantes en diversos procesos industriales (Anastassiadis, 2003), en el análisis clínico (Hosseinkhani y Nemat-Gorgani, 2003), en el procesamiento de alimentos (Morato y col., 2000), en la agricultura (Belghith y col., 2001) y en la biotecnología (Matsushima y col., 1996). Otra aplicación importante de estas biomoléculas lo constituye su uso como fármacos para la enzimoterapia de numerosas enfermedades (Veronese y Morpurgo, 1999).

La función catalítica que desempeñan las enzimas está estrechamente relacionada con su compleja estructura molecular, la cual define la conformación del sitio activo de ellas. En este sentido, la acción cooperada de diferentes factores físico-químicos contribuye a estabilizar la estructura tridimensional activa de estas proteínas.

Estabilidad de las enzimas.

La estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas está determinada por un delicado balance de fuerzas contrapuestas que puede ser fácilmente roto mediante factores químicos y/o físicos como: el calor, el oxígeno, los ácidos o álcalis, los agentes surfactantes o caotrópicos y los solventes orgánicos (Klibanov, 1983).

El proceso de desnaturalización proteica puede ocurrir en sectores locales de la molécula o ser un proceso global que afecta a toda la estructura, lo cual puede ocurrir de manera simultánea o independiente. El incremento de la concentración de agentes desnaturalizantes o el aumento de la temperatura pueden promover selectivamente la desnaturalización global de la proteína (Wang, 1999).

La inactivación, por su parte, es un proceso irreversible que causa la pérdida completa de la actividad biológica de la proteína en cuestión. Después de la desnaturalización, pueden ocurrir procesos sobre el estado desplegado de la proteína como son: la pérdida de cofactores, agregación y precipitación, plegamientos incorrectos, cambios químicos y

disociación de subunidades; estos conllevan a un cambio irreversible en la estructura proteica, (O'Fágáin, 1995).

Estos dos procesos permiten distinguir entre dos tipos de estabilidad proteica: la estabilidad conformacional o termodinámica referida a la resistencia de la estructura proteica a la desnaturalización y la estabilidad cinética que refleja la resistencia a la inactivación (O'Fágáin, 1995).

Estabilización de enzimas por modificación con derivados de carbohidratos

El uso práctico de las enzimas se ha visto frenado por la baja estabilidad que presentan bajo ambientes diferentes de los encontrados en el medio biológico. Por tal motivo, el desarrollo de nuevas estrategias orientadas a incrementar la estabilidad conformacional, unido a la mejora de las propiedades catalíticas de estos biocatalizadores, es una de las mayores prioridades de investigación de la tecnología enzimática.

La modificación química de proteínas resulta un método rápido y económico, pero requiere de un control estricto de las condiciones de reacción para lograr conjugados con una alta retención de la actividad biológica. Mediante la unión covalente de moléculas de bajo peso molecular y polímeros hidrofílicos a la superficie de las moléculas de proteínas se logran preparados solubles con una elevada estabilidad frente a las altas temperaturas, la presencia de solventes orgánicos y de agentes caotrópicos (Gómez y col., 2001; Ramírez y col., 2002).

El empleo de carbohidratos como agentes estabilizantes de las enzimas se basa en la inducción de nuevas interacciones que favorezcan los mecanismos mediante los cuales las proteínas mantienen su estabilidad conformacional en la Naturaleza. Tal es el caso de la formación de entrecruzamientos intramoleculares covalentes, el incremento del grado de hidrofiliidad superficial de estos polipéptidos, la inducción de puentes de hidrógeno, así como la creación de interacciones electrostáticas superficiales en los casos que se empleen derivados de carbohidratos iónicos (Villalonga y col., 2000).

La glicosidación química de polipéptidos se presenta como una metodología que permite obtener conjugados, denominados neoglicoenzimas, que mimetizan a las glicoenzimas naturales en cuanto a la actividad biológica y su marcada estabilidad estructural y funcional (Mislovicová y col., 2002b). Entre las propiedades fisicoquímicas y terapéuticas de las proteínas que pueden ser mejoradas significativamente están:

I) El aumento de su unión a los blancos biológicos mediado por receptores específicos para carbohidratos (Masárova y col., 2001; Mislovicova y col., 2002a).

- II) La alteración de las propiedades inmunológicas y alergénicas de las proteínas.
- III) El mejoramiento de las propiedades farmacológicas debido a que aumentan la persistencia de las proteínas en el organismo (Pérez. y col, 2005).
- IV) La alteración de la estabilidad debido a la prevención de la agregación no específica, resistencia al ataque de proteasas y aumento de la estabilidad conformacional.
- V) Un incremento de la solubilidad en solución acuosa y en los fluidos biológicos (Khmelnitsky, 2004).

Los polisacáridos utilizados en la estabilización de proteínas presentan una gran heterogeneidad estructural. Se ha reportado la estabilización de la tripsina mediante polímeros aniónicos como la carboximetilcelulosa (Villalonga y col, 2000), derivados de ciclodextrina (Fernández y col., 2002; Fernández y col., 2003; Villalonga y col, 2005a), entre otros.

La alta solubilidad en agua, la baja toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad de muchos carbohidratos son propiedades que han favorecido su amplio uso como agentes modificantes para enzimas. Así mismo, la naturaleza polihidroxílica de estas moléculas ofrece la posibilidad de su activación y conjugación multipuntual con las proteínas, factor que constituye la estrategia básica para la estabilización de estos biocatalizadores (Marshall, 1978).

Carboximetilcelulosa.

La carboximetilcelulosa (CMC) es un copolímero formado por unidades de D- glucosa no sustituidas, mono- sustituidas (2-,3- y 6-mono-*O*-carboximetil-D-glucosa), di-sustituidas (2,3-, 2,6- y 3,6-di-*O*- carboximetil- D- glucosa) y tri- sustituidas (2, 3, 6-tri-*O*- carboximetil -D- glucosa) (Heinze y col., 1994). Por constituir un polímero no tóxico, biocompatible y biodegradable, ha encontrado innumerables aplicaciones en la industria farmacéutica (Rossi y col., 1999), procesadora de alimentos (Wang y col., 1999), entre otras.

Este polisacárido fue empleado en la obtención de conjugados enzimáticos de invertasa y tripsina, los cuales resultaron mucho más estables que sus contrapartes nativas frente a condiciones desnaturalizantes (Villalonga y col., 1999; Villalonga y col., 2000).

Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos de α -D-glucopiranosos unidos mediante un enlace α -(1,4), presentan una cavidad central hidrofóbica y una superficie exterior hidrofílica. La conformación de silla que poseen las unidades de glucosa que forman las CDs, permite que estas presenten una estructura de cono truncado, donde los hidroxilos primarios o unidos al carbono 6 están ubicados en los bordes de la parte estrecha del cono y los hidroxilos secundarios o unidos a los carbonos C-2 y C-3 están ubicados en los bordes de la parte ancha del cono como se puede apreciar en la **Figura 1** (Zhu y col., 2007).

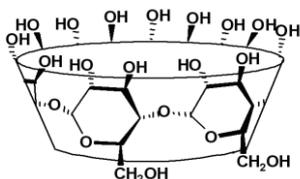


Figura 1. Estructura de la β ciclodextrina.

La molécula de CD posee una cavidad central esencialmente apolar y un exterior con grupos hidroxilos disponibles para la interacción hidrofílica por formación de puentes de hidrógeno. Las dimensiones de la cavidad, que dependen del número de unidades de glucopiranosos, son tales que ellas pueden hospedar a una molécula orgánica de tamaño adecuado (Fragoso y Cao, 1995). Entre las moléculas que pueden ser reconocidas molecularmente por las CDs se encuentran las proteínas (Kamphorst y col., 2004).

Las CDs tienen multitud de aplicaciones en la industria farmacéutica, tecnología de alimentos, cosmética, química analítica, tecnología medioambiental y otros (Matsuda y col., 1999; Kaewpresert y col., 2002). Los derivados de carácter polimérico de las ciclodextrinas han sido muy utilizados en la separación cromatográfica y en la solubilización de fármacos (Valdivia y col., 2006).

Los nuevos materiales poliméricos derivados de este compuesto tienen diversas aplicaciones, entre las que podemos citar:

- ◆ Aplicaciones en tecnología de alimentos como son: la preparación de nuevos materiales de envasado y la formulación de alimentos exentos de alguno de los componentes naturales.
- ◆ Aplicaciones en la síntesis y aislamiento de productos químicos, en particular de productos enantioméricos.
- ◆ Extracción de aromas de fuentes naturales.
- ◆ Extracción de productos tóxicos de aguas residuales.
- ◆ Aplicaciones farmacológicas como la dosificación controlada de medicamentos.

Recientemente, las CDs y sus derivados han sido utilizados para modificar la superficie proteica de varias enzimas, ya sea por modificación química como a través de la inducción de asociaciones supramoleculares. En este sentido, Fernández y col. (2003) informaron el incremento de las propiedades funcionales de la tripsina de páncreas bovino por modificación de su superficie proteica con derivados monoaminados de la β -ciclodextrina. Los conjugados obtenidos por esta vía, a pH 9.0, fueron mucho más estables que la enzima nativa frente a condiciones desnaturalizantes de altas temperaturas y degradación autolítica (Fernández y col., 2003).

Glucosa Oxidasa

La glucosa oxidasa (EC1.1.3.4, GOx) es una flavoproteína que cataliza la oxidación de la β -D-glucosa en ácido glucónico con la utilización del oxígeno como aceptor de electrones (Fig 2). Durante la reacción se produce H_2O_2 que se transforma en O_2 y H_2O por acción de la catalasa, la cual constituye el principal contaminante de las preparaciones enzimáticas.

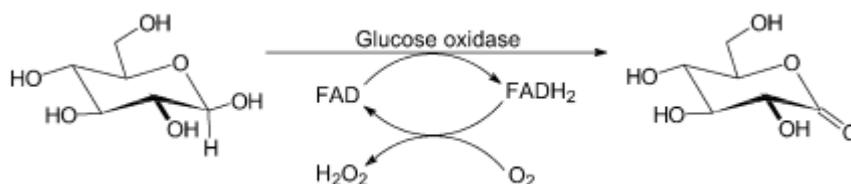


Fig. 2. Reacción catalizada por la glucosa oxidasa.

La enzima está unida al FAD, como cofactor, de forma no covalente para oxidar el azúcar a lactona. El cofactor reducido ($FADH^{\cdot}$) es reoxidado por el oxígeno molecular en el mecanismo cinético Ping Pong (Gibson y col., 1964). Los sustratos de la enzima se pueden separar en dos grandes grupos: los donadores de electrones en la primera reacción de reducción, y los aceptores en la segunda mitad de la reacción de oxidación. La D glucosa se considera el mejor de los sustratos de la primera reacción mientras que el oxígeno se destaca entre los mejores en la segunda reacción (Leskovaca y col., 2005)

Estabilización de la glucosa oxidasa con el polímero CMC-CD.

En investigaciones realizadas en el Centro de Estudios de Tecnología Enzimática de la Universidad de Matanzas, el polisacárido carboximetil celulosa ciclodextrina-ciclodextrina (CMC-CD) se unió covalentemente a los grupos aminos localizados en la superficie proteica de la enzima GOx, para lo cual se utilizó una carboimida soluble en agua como

agente acoplante. Después de la purificación del conjugado se estudiaron sus propiedades estructurales y su estabilidad.

La enzima modificada contenía 244 mol del carbohidrato por mol de proteína, lo cual representa 0.78 mol de polisacárido por mol de enzima, con un promedio de 21 mol de grupos aminos modificados en el conjugado GOx-CMC-CD. El grado de entrecruzamiento intramolecular del complejo fue de 27 mol de grupos aminos por mol de polímero, en cada mol de proteína modificada.

La enzima retuvo el 67% de su actividad específica después de la conjugación, la K_m de la forma nativa fue de 29.4 μM , mientras en la enzima modificada fue de 32.7 μM . Esta reducción de la catálisis en la enzima modificada puede justificarse por la baja accesibilidad del sustrato a los sitios activos de la GOx, debido al impedimento estérico causado por las cadenas del polímero unidas a la superficie de la enzima. Efectos similares se han informado para otros conjugados enzimáticos unidos a polisacáridos (Villalonga y col., 2005; Darias y col., 2001; Fernández y col., 2004; Gómez y col., 2001).

En el estudio del espectro de emisión de fluorescencia de la Gox y la GOx-CMC-CD, antes y después de la incubación a 55°C, ambas formas mostraron un máximo de emisión de fluorescencia a 340 nm, lo cual es característico de los residuos de triptófano en la parte hidrofóbica de la estructura proteica. Sin embargo, después del tratamiento a 55°C, hubo un incremento en la intensidad de la fluorescencia en la enzima nativa. Similares resultados se han descrito anteriormente para la GOx, lo cual puede deberse a la liberación del cofactor FAD de la estructura proteica. Esta enzima posee 7 residuos de triptófano, cercanos a la molécula FAD en la estructura nativa, y la intensidad de la fluorescencia de la molécula proteica es mediada por la transferencia de energía Förster desde los residuos de triptófano hacia el grupo flavina del cofactor (Haouz y col., 1998).

El espectro de emisión de fluorescencia del conjugado mostró una banda secundaria a longitudes de onda menores, lo cual es característico en la conjugación de enzimas con derivados de la ciclodextrina. Este resultado sugiere la formación de estructuras proteicas más compactas debido a la formación de complejos supramoleculares entre el receptor molecular (CD) y los residuos de aminoácidos aromáticos de la enzima (Villalonga col., 2007). La respuesta de la fluorescencia en el conjugado no se incrementó después del tratamiento a 55°C, lo cual sugiere que los entrecruzamientos con el polímero le pudieran conferir estabilidad a la enzima y evita la liberación de la molécula de FAD.

La modificación de la GOx-CMC-CD incrementó la T_{50} desde 45°C hasta 51°C, así como mejoró su estabilidad térmica, ya que incrementó 5 veces el tiempo de vida media de la

enzima al compararla con la nativa a 40°C. Por otra parte, hubo una retención de la actividad enzimática de 75% en presencia de agentes surfactantes como SDS después de su incubación durante 3 horas, así como se incrementó su estabilidad a diferentes valores de pH.

Estos resultados sugieren que la glicosilación de la enzima brinda estabilidad a la conformación nativa de la proteína cuando se expone a diferentes condiciones de inactivación/desnaturalización. La estabilidad puede estar asociada con el entrecruzamiento intramolecular que muestra el conjugado, debido a las uniones multipuntuales de las cadenas del polímero a la estructura de la proteína (Villalonga y col., 2005; Darias y col., 2001; Fernández y col., 2004). También las interacciones aniónicas y supramoleculares de la enzima y la CMC-CD pueden brindar estabilización, tal como se ha descrito para otros neoglicoconjugados (Villalonga y col., 2003; Darias y col., 2002).

Conclusiones

La transformación covalente de la glucosa oxidasa con el polímero CMC-CD mostro la efectividad de esta estrategia, en el mejoramiento de la estabilidad bajo diferentes condiciones desnaturizantes. La glicosilación de la enzima redox, con el CMC-CD podría ser una herramienta para elevar la resistencia funcional de este biocatalizador.

Bibliografía.

- Anastassiadis, S., Aivasidis A., Wandrey C. (2003). Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 110–117.
- Darias, R., Herrera, I., Fragoso, A., Cao, R., Villalonga, R. (2002). Supramolecular interactions mediated thermal stabilization for α -amylase modified with a β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer, *Biotechnol. Lett.* 24, 1665-1668.
- Darias, R., Villalonga, R. (2001). Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 489-493.
- Du, Y., Luo, X.L., Xu, J.J., Chen, H.Y. (2006). A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor, *Bioelectrochemistry* 71, 44-49.

- Fernández, M., Fragoso, A., Cao, R., Baños, M., Villalonga, R. (2002). Chemical conjugation of trypsin with monoamine derivatives of cyclodextrins. Catalytic and stability properties. *Enzymes and Microbial Technology* **31**, 543-548.
- Fernández, M., Villalonga, M.L., Caballero, J., Fragoso, A., Cao, R., Villalonga, R. (2003). Effects of β -Cyclodextrin-Dextran Polymer on Stability Properties of Tripsin. *Biotechnology and Bioengineering*. **83**, 6-11.
- Fernández, M., Villalonga, M.L., Fragoso, A., Cao, R., Baños, M., R. Villalonga, (2004). α -Chymotrypsin stabilization by chemical conjugation with O-carboxymethyl-poly- β -cyclodextrin, *Process Biochem.* 39, 535-539
- Fragoso A, Cao R. (1995). Superoxide dismutase mimetic activity of the metal (II) complexe of a dithiocarbamate derivative of β cyclodextrin. *J Carbohydrate Polym*; 43: 81-85.
- Gibson, Q. H.; Swoboda, B. E. P.; Massey, V. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 3927.
- Gómez, L., Ramírez, H.L., Villalonga, R. (2001).Chemical modification of α -amylase by sodium alginate, *Acta Biotechnol.* 21, 265-273.
- Heinze T, Heinze U, Klemm D. (1994).Viscosity behavior of multivalent metal ion-containing carboxymethyl cellulose solutions. *Angew Macromol Chem*; 220: 123-132.
- Hosseinkhani, S.,Nemat-Gorgani, M.(2003).Partial unfolding of carbonic anhydrase provides a method for its immobilizations on hydrofobic adsorbents and protects it against irreversible thermoinactivation. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**: 179-184.
- Kaewpresert S, Okada M, Aoyama Y. (2002). Metallothionein m RNA levels are influenced by dietary ciclodextrins in rats. *J Nutr Biochem*; 13: 219-225.
- Khmelnitsky, Y.L. (2004).Current strategies for in vitro protein glycosylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **31**:73-81
- Klibanov, A.M. (1983). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advance in Applied Microbioogyl*. **29**: 1-28.
- Leskovaca V., Trivi S., Wohlfahrt G., Kandra J. Perić cina D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *J Bioch & Cell Biol*: 37, 731–750.
- Marshall, J.J. (1978). Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate.*Trends Biochemistry.Sci.***3**:79-81.

- Masárova, J., Mislovicová, D., Gemeiner, P., Michalková, E. (2001). Stability enhancement of *Escherichia coli* penicillin G acylase by glycosidation with yeast mannan. *Biotechnology Applications Biochemistry*.**34**:127-133.
- Matsuda H, Arima H. (1999). Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery drug. *Adv Drug Deliv Rev*; 36: 81-99.
- Mislovicova, D., Masárová, J., Svitel, J., Mendichi. R., Soltés, L., Gemeiner, P., Danielsson, B. (2002a). Neoglycoconjugates of Mannan with Bovine Serum Albumin and Their Interaction with Lectin Concanavalin A. *Bioconjugate Chemistry*.**13**:136-142.
- Mislovicová, D., Masárová, J., Svitel, J., Gemeiner, P. (2002b). Influence of mannan epitopes in glycoproteins-Concanavalin A interaction. Comparison of natural and synthetic glycosylated proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. **30**:251-258.
- Morato, A.F., Carreira, R.L., Junqueira, R.G., Silvestre, P.C. (2000). Optimization of Casein Hydrolysis for Obtaining High Contents of Small Peptides: Use of Subtilisin and Tripsin. *Journal of Food Composition And Analysis* **13**:843-857.
- O'Fágáin, C., (1995). Understanding and increasing proteins stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1252**: 1-14.
- Perez. Y., Valdivia. A., Gómez. L., Simpson. B.K., Villalonga. R. (2005). Glycosidation of Cu, Zn -Superoxide Dismutase with End-Group Aminated dextran. Pharmacological and Pharmacokinetics Properties. *Macromolecule Bioscience*. **5**: 1220-1225.
- Ramírez, H.L., Chico, B., Villalonga, R. (2002). Invertase Stabilization by Chemical Modification of Sugar Cahins with Carboxymethylcellulose. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. Vol. **17**.
- Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Caramella C. (1999). Drug release and washability of mucoadhesive gels based on sodium carboxymethylcellulose and polyacrylic acid. *Pharm Dev Technol*; 4: 5563.
- Tsuge, H., Natsuakai, O., Ohashi, K. (1975). Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Asperigillus niger*, J. Biochem. 78, 835-843.

- Tsuge, H., Natsuakai, O, Ohashi, K. (1975). Purification, properties and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *J. Biochem.* 78, 835-843.
- Valdivia, Y. Pérez, H.L. Ramírez, R. Cao, R. Villalonga, Improved pharmacological properties for superoxide dismutase modified with β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer, *Biotechnol. Lett.* 28, 1465-1470 (2006).
- Veronese. F.M and Morpurgo. M. (1999). Bioconjugation in pharmaceutical chemistry. *IL Farmaco* 54: 497-516.
- Villalonga M.L., Fernández M., Fragoso A., Cao R., Villalonga R., (2003). Functional stabilization of trypsin by conjugation with β -cyclodextrin-modified carboxymethylcellulose, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 33, 53-66
- Villalonga, R., Tachibana, S., Pérez, Y., Asano, Y. (2005). Increased conformational and thermal stability properties for phenylalanine dehydrogenase by chemical glycosidation with end-group activated dextran, *Biotechnol. Lett.* 27, 1311-1317 () .
- Villalonga, R., Gómez, L., Ramírez .L., Villalonga, M.L. (1999). Stabilization of α -amilase by chemical modification with carboxymethylcellulose. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology.* 74:635-638.
- Villalonga. M.L., Reyes. G., Fragoso. A., Cao. R, Fernández. L. Villalonga. R. (2005a). Chemical glycosidacion of tripsin with O-carboximethyl-poly-beta-cyclodextrin: catalytic and stability properties. *Biotechnology and Applications Biochemistry.* 41: 217-223.
- Villalonga. R., Villalonga. M.L., Gómez. L. (2000). Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10: 483-489.
- Wang, W. (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* .185: 129-188.
- Xue, M. H., Xu, Q., Zhou, M., Zhu, J.J. (2006). In situ immobilization of glucose oxidase in chitosan-gold nanoparticle hybrid film on Prussian Blue modified electrode for high-sensitivity glucose detection, *Electrochem. Commun.* 8, 1468-1474 .
- Zhu X, Wang H, Chen Q, Yang W, Yang G. Preparation and characterization of inclusion complex of iprodione and β -cyclodextrin to improve fungicidal activity. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 3535-3539.

Zoldak, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupak, Sedlak, M., E. (2004). Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure, *J. Biol. Chem.* 279, 47601-47609.