

# Mikroszemcsés bovin szérum albumin előállítása kéméletes szárítással

TÓTH Judit<sup>a\*</sup> és PALLAI-VARSÁNYI Erzsébet<sup>b</sup>

<sup>a</sup> MTA Kémiai Kutató Központ, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Pusztaszeri út 59-67., H-1025 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup> Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Egyetem utca 2., H-8200 Veszprém, Magyarország

## 1. Bevezetés

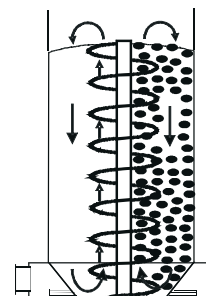
A peptid és fehérje hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek jelentősége növekvő tendenciát mutat a biotechnológia gyors fejlődésének köszönhetően.<sup>1</sup> Ezen a területen fontos feladatot jelent a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező fehérje porok előállítása, mint például a hatóanyagok inhalációs, tüdőn keresztüli bevitelére alkalmas szerformátumok kifejlesztésénél.<sup>2</sup> Az ilyen típusú hatóanyagok előállítása során különös figyelmet kell fordítani a biológiai hatékonyságot meghatározó kémiai és fizikai jellemzők, a biológiai hatékonyság megőrzésére. A biológiai hatékonyság szempontjából meghatározó lehet a kinyert fehérje porok szemcsemérete is: gyakori követelmény a 10 µm alatti átlagos szemcseméret biztosítása.<sup>3</sup> Megfelelő minőségű finomszemcsés termék nyerése érdekében, különösen hőérzékeny anyag esetében, döntő fontosságú az alkalmas szárítási eljárás megválasztása. Fehérjék szárítására általában a fagyasztva szárítást, a liofilizálást alkalmazzák.<sup>4</sup> A hosszú száradási idő, a jelentős költségigény, továbbá a szárítás folyamán előálló fehérje instabilitási problémák miatt egyéb szárítási módok, mint például a porlasztva<sup>5</sup> - ill. porlasztva-fagyasztva szárítás<sup>6</sup> kerültek előtérbe, de a szigorú követelményeket kielégítő, megfelelő minőségű és szemcseméretű fehérje porok előállítása még továbbra sem tekinthető megoldottnak. A fluidizált rétegű, intenzív gáz-szilárd érintkezést biztosító eljárások előnyösen alkalmazhatóak ugyan hőérzékeny anyagok kéméletes szárítására, azonban a 10 µm körüli szemcseméret tartományban (Geldart C csoport)<sup>7</sup> nem tartható fenn a finomszemcsés termék állandósult fluidizációs mozgásállapota. A probléma megoldását jelentheti az inert töltet szemcsék felületén megvalósított szárítás, például, gejzír-rétegű szárítóban.

### 1.1. Szárítás inert töltet szemcsék felületén

Hőérzékeny anyagokat tartalmazó oldatok vagy nagy nedvességtartalmú szuszpenziók nedvességének elvonása meglehetősen nehéz feladat. Nagy hő- és anyagátadási felületek biztosítása szükséges a rövid száradási idő, valamint a megengedett, viszonylag alacsony szárítási hőmérséklet eléréséhez. Ilyen jól szabályozható szárítási körülmények biztosíthatók a belső szállítócsigával ellátott mechanikus gejzír-száritóban, az ún. MGSZ-berendezésben. Eltérően a hagyományos gejzír elven működő szárítóktól, ahol a szemcsemozgást a megfelelő levegőáram biztosítja, az MGSZ-száritóban a szemcseréteg cirkulációját a szárító függőleges tengelye mentén beépített, ház nélküli szállítócsiga tartja fenn, ezáltal a szárítólevegő térfogati sebessége a szárítás igényének megfelelően választható. A felmelegített levegő a szárító kúpos alján, réseken keresztül,

tangenciális irányítottsággal lép be jelentős sebességgel. E térrészben intenzív a gáz-szilárd fázisok érintkezése, ennek következtében a száradás lényegében a kúpos szárítóaljban megy végbe. Inert töltetet alkalmazva nagy nedvességtartalmú, hőérzékeny anyagok kéméletes szárítása valósítható meg.<sup>8</sup>

A szárítóban cirkuláló réteg három jellegzetes zónából áll: az említett, intenzív szemcsemozgással jellemezhető ún. „szárítási zónából”, a tömörebb „csúszó rétegű körgyűrűt alkotó térrészből”, amelybe beporlasztva a nedves anyagot, a cirkuláló inert szemcsék felületén kialakul egy filmszerű bevonat, valamint a „koptatási zónából” a szállítócsiga forgási terében (1. Ábra).



1.Ábra Az inert töltetes mechanikus gejzír-száritó berendezés vázlata.

Ez utóbbi térrészben megy végbe a megszáradt bevonat lekopása az inert szemcsék felületéről, majd a száraz, porszerű termék a távozó levegővel együtt hagyja el a szárítót. A száradási idő a szárítólevegő sebességén és hőmérsékletén kívül jelentős mértékben az inert szemcsék felületén kialakult bevonat vastagságával<sup>9</sup> befolyásolható. Feltételezve, hogy a filmszerű bevonat száradása során a diffúziós ellenállás lényegében elhanyagolható, a száradás mintegy állandó sebességgel, viszonylag alacsony hőmérsékleten (a nedves hőmérő hőmérsékletén) valósulhat meg. Figyelembe véve ezen eljárás előnyeit, beleértve a széleskörűen és egyszerűen megvalósítható szabályzási lehetőségeket is, a szárítási kísérleteknél az inert töltetes gejzír eljárást alkalmaztuk.

Munkánk célja volt hőérzékeny, bovin szérum albumin (BSA) fehérje száradási folyamatának vizsgálata laboratóriumi méretű inert töltetes mechanikus gejzír-száritóban. Aközelebbi cél mikroszemcsés ( $d_v < 10 \mu\text{m}$  átlagos szemcseméretű) fehérje-por előállítása kizárólag BSA-t, valamint poli(etilén-glikol) adalékanyagot ( $M_w = 6000$ , PEG 6000) is tartalmazó oldatokból, az oldható fehérjetartalom megőrzésével. Aszáritást megelőző műveletekben alkalmazott

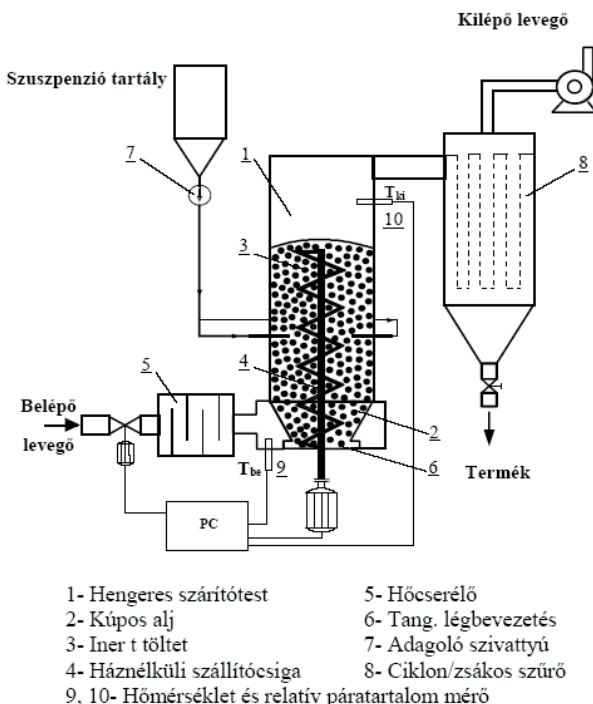
\*Tóth Judit. Tel.: +36 (88) 62-4032; fax: +36 (88) 62-4038; e-mail: toth@mukki.rchem.hu

segéd- és adalékanyagok hatással lehetnek a szárított termék minőségére. A fehérjék tisztítására, elválasztására használt PEG, például, szennyezőként jelenhet meg a szárítandó fehérjeoldatokban, szuszpenziókban.<sup>10</sup> Másrészt irodalmi adatok alapján fizikai adszorpcióval, vagy kovalens kötéssel a fehérjékhez kapcsolódó poli(etilén-glikolok) visszatartó hatást gyakorolhatnak a fehérjék felszabadulására kompozitjaikból.<sup>11</sup> A vizsgálatok kiterjedtek a meghatározó műveleti paraméterek, valamint a PEG adalékanyag által a szemcseméretre, a fehérjetartalomra, illetve a szárítmány nedvességére gyakorolt hatás tanulmányozására.

## 2. Kísérleti rész

### 2.1. Szárítási kísérletek

A saját fejlesztésű laboratóriumi méretű inert töltetes mechanikus gejszárító két fő részből áll, egy 90 mm belső átmérőjű, 500 mm hosszúságú hengeres elemből, és egy 55 mm-re szűkülő, 75 mm hosszú kúpos készülékalkaljból. A belső szállítócsiga átmérője (35 mm) megfelelt a hagyományos szárítóban a légbevezető fűvókán keresztül nagy sebességgel belépő levegősugár által kialakított ún. „gejszárító gázcsatorna” méretével. A szárítási kísérletek során a készülékalkaljból réseken keresztül, tangenciális irányítottággal bevezetett szárítólevegő áramlási sebességét mérőperemmel, a felmelegített levegő hőmérsékletét belépéskor, valamint a kilépésnél NiCr-Ni termoellemmel mértük. A gejszárítórendszer vázlata a 2. Ábrán látható. Inert töltetként egyenként 7,6 mm átmérőjű, 2300 g össztömegű paraformaldehid anyagú szemcsét használtunk. A BSA-oldatot a szárító két oldalán porlasztottuk be a csúszo rétegű tömörebb rétegzónába perisztaltikus szivattyú segítségével. A szárítóból a levegőárammal kilépő száraz, mikroszemcsés BSA porterméket ciklonon, majd sűrűszövésű porzsákon átvezetve nyertük ki. A hőmérséklet és a levegőáram szabályozása számítógéppel történt.



2. Ábra. Az inert töltetes, mechanikus gejszárítórendszer vázlata.

A szárítási kísérletekhez felhasznált bovin szérum albumint (98%) a Sorachim, a PEG 6000-t pedig a Fluka cégtől szereztük be. A szárítási kísérletekhez a  $c_{BSA} = 40$  g/l koncentrációjú BSA-oldatok kétszer desztillált vízzel készültek. A PEG tartalmú BSA-oldatok előállítására céljából számított mennyiségű szilárd PEG 6000-t adtunk a 40 g/l koncentrációjú BSA oldatokhoz. A szárítási kísérletek során minden alkalommal 240 ml oldatot porlasztottunk a cirkuláló inert szemcsék felületére  $q = 3$ , illetve 4 ml/perc adagolási sebességgel. A szemcsék cirkulációs idejét ( $\tau_c$ , a szárítóban egyszeri teljes cirkuláció megtételéhez szükséges időt), valamint a szárítási időt ( $\tau_{sz}$ ) is meghatározó szállítócsiga kerületi sebességét  $N_{cs} = 0,39 - 0,96$  m/s tartományon belül változtattuk. A különböző hőmérsékleteken belépő szárítólevegő hatásának vizsgálata céljából a kísérleteket  $T_{be} = 40, 60, 80$  és  $100$  °C hőmérsékleteken végeztük.

### 2.2. Mérési és értékelési módszerek

A szárítmány átlagos szemcseméretét Malvern-2600 típusú, lézerfény diffrakció elvén működő analizátorral határoztuk meg. A porszerű szárítmányt az analízist megelőzően diklórometánban diszpergáltuk, a szemcseméret jellemzésére a térfogati átlagméretet,  $d_v$  adtuk meg. A szárítmány nedvességét ( $M_{szn}$ , m/m%) vákuumszárítóban,  $30$  °C hőmérsékleten, 6 óras szárítás után tömegméréssel határoztuk meg. Az oldható fehérjetartalom meghatározásához adott mennyiségű szárítmányt oldottunk kétszer desztillált vízben. Az oldhatatlan maradékot (20 perc, 6000 ford./perc) Janetzky T-30 típusú centrifugában választottuk el. A visszaoldható fehérje tartalmat a felülúszóból spektrofotometriás módszerrel, Biochrom 4060 típusú készüléken  $280$  nm-nél mért abszorbancia érték alapján határoztuk meg. A szárítás során megőrzött fehérje tartalmat a szárítmány mért m/m%-os oldható fehérje tartalmával ( $c_{BSA,sz}$ ) fejeztük ki.

### 2.3. Kísérleti eredmények

Az inert töltet szemcsék felületén kialakult bevonat száradási ideje nagymértékben függ a bevonat vastagságától,<sup>12</sup> mely optimális esetben kisebb, mint  $20 \mu\text{m}$ . A bevonat vastagság megfelelő értéken tartásával a száradási időn kívül a szárítmány szemcsemérete, valamint nedvessége is befolyásolható. Fontos szempont továbbá, hogy az inert tölteten megvalósított szárítási részfolyamatok, vagyis a bevonási, szárítási és a kopotási részfolyamatok egyetlen cirkulációs periódus alatt teljes mértékben végbemenjenek. Ennek érdekében a műveleti paramétereket, elsősorban az adagolási sebességet, a szemcsék cirkulációs idejét, valamint a kopotást össze kell hangolni. A műveleti paraméterek hatását a szárítmány szemcseméretére ( $d_v$ ), a nedvességére ( $M_{szn}$ ) és az oldható fehérjetartalomra ( $c_{BSA,sz}$ ) vonatkozóan az 1. Táblázatban mutatjuk be.

Az a, b, és c mérésekben a belépő levegő hőmérséklete  $40$  °C volt, míg a szállítócsiga forgásebességét  $0,39 - 0,96$  m/s kerületi sebességek tartományában változtattuk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a szállítócsiga forgásebességének csökkentésével (a cirkulációs, valamint a szárítási idők növelésével) jól látható mértékben csökken a szemcseméret. A száradási idő növelésével ugyanis a bevonat egyre jobban kiszárad, ami pedig a kopás hatékonyságát segíti elő, így az inert szemcséket beborító megszáradt bevonat teljes mértékben lekopik, egyre finomabb szemcséjű

1. Táblázat. Szárítási kísérletek és eredmények.

No	$T_{br}$ °C	$T_{ki}$ °C	$N_{cs}$ m/s	$\tau_c$ s	$\tau_{sz}$ s	$d_v$ µm	$M_{szn}$ m/m%	$c_{BSA,sz}$ m/m%
a <sup>1</sup>	40	22.2	0.96	44.1	8.8	77.85	5.07	87
b <sup>1</sup>	40	20.3	0.52	49.0	9.8	32.80	5.15	84
c <sup>1</sup>	40	24.2	0.39	55.1	11.0	21.92	5.20	86
d <sup>2</sup>	40	25.2	0.52	49.0	9.8	18.45	5.15	84
e <sup>2</sup>	60	38.3	0.52	49.0	9.8	15.40	4.46	93
f <sup>2</sup>	80	50.7	0.52	49.0	9.8	16.99	4.37	91
g <sup>2</sup>	100	70.0	0.52	49.0	9.8	8.55	2.37	97

<sup>1</sup> q = 4,5 ml/perc, <sup>2</sup> q = 3 ml/perc

termék keletkezése közben. A legnagyobb szállítócsiga forgássebesség (0,96 m/s) mellett a cirkulációs, illetve a száradási idő olyan mértékben csökken, hogy a bevonatnak csak a felületi rétege szárad le a kopáshoz szükséges nedvességtartalomra, vagyis a bevonat nem kopik le teljesen. Ennek megfelelően a következő periódusban a szemcsére rávitt újabb nedves bevonattal a vastagság tovább növekszik. Az egyre növekvő szemcseméret, valamint a rétegmagasság folyamatos növekedése jelzi, hogy az ismertetett részfolyamatok összehangolása utóbbi esetben nem valósult meg.

Az inert szemcsék felületén kialakult bevonat vastagság ellenőrzésére az 1. Táblázatban megadott kísérleti körülmények figyelembevételével számítást végeztünk. A szárító jellemző méretadatain kívül két jellegzetes paraméter értékkel, azaz a szállítócsiga forgássebességének  $n_{cs} = 4,7 \text{ s}^{-1}$  adatával, valamint az adagolási sebesség  $q = 4,5 \text{ ml/perc}$  (azaz  $7,5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ) értékével számoltunk. A nedves filmszerű bevonat vastagságának átlagos értéke,  $\delta$  a következő összefüggéssel számítható:

$$\delta = q / Q_{cs} \omega$$

ahol  $q$  a fehérje oldat adagolási sebessége,  $Q_{cs}$  a belső szállítócsiga szállítási sebessége,  $\omega = 6/d_i$  az inert szemcsék fajlagos felülete,  $d_i = 7,6 \cdot 10^3 \text{ µm}$  pedig az inert szemcsék átlagos átmérője. A szállítócsiga kísérleti úton meghatározott szállítási sebessége  $Q_{cs} = 1,66 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ . Az ismertetett adatokkal a számított bevonat vastagság 5,94 µm-nek adódott.

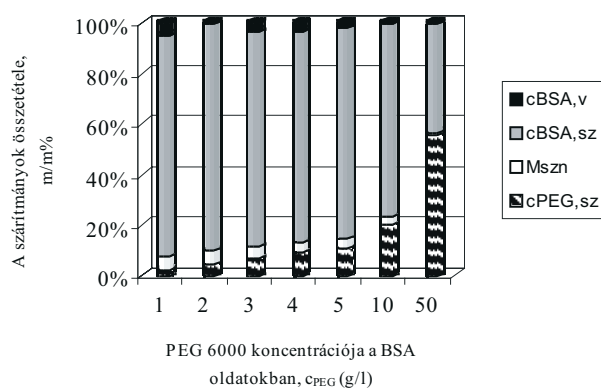
A d, e, f és g kísérleteket állandó szállítócsiga forgássebesség és fehérje-oldat adagolási sebesség mellett, de változó levegő hőmérsékletek (40, 60, 80 és 100 °C) alkalmazásával végeztük. Az adatokból látható, hogy a szárítvány nedvessége döntően a szárítólevegő hőmérsékletétől függ. Az eredmények azt mutatják, hogy a hőmérséklet növekedésével csökken a szemcseméret és a fehérje portermék nedvességtartalma is. A megfelelően megválasztott műveleti körülmények eredményeképpen a szárított termék szemcsemérete a g mérés esetében 10 µm alá csökkent.

Hőérzékeny fehérjék szárítását követően igen fontos a szárított termék kémiai stabilitásának vizsgálata. Ennek jellemzésére szolgálhat a szárítvány oldható fehérje tartalmának meghatározása ( $c_{BSA,sz}$  adatok az 1. Táblázatban).

A kapott eredmények, miszerint az alacsony szárítási hőmérséklet mellett előállított fehérje szárítványokban a megőrzött, oldható fehérjetartalom kisebb (< 90 %), mint a magasabb hőmérsékleten szárított termékek esetén (> 90 %), bizonyos fokig meglepőek. Figyelembe véve azonban, hogy a stabilitást a hőmérsékleten kívül a termék nedvességtartalma is befolyásolhatja (100 °C alatt végzett szárítás esetén 3 % alatti érték), az eredmények magyarázhatóak. Az oldható fehérje megőrzése a szárítás folyamán függ a szemcsék tartózkodási idejétől a szárítási zónában, vagyis a szárítási időtől ( $\tau_{sz}$ ). Az inert szemcsékből álló rétegben az igen nagy gáz-szilárd érintkezési felületnek és a filmszerű bevonatnak köszönhetően a száradási idő igen rövid, még az alacsony, a nedves hőmérő hőmérsékletének megfelelő hőmérsékleten is. A szárítási zóna felett, a szállítócsiga forgásterében a száraz bevonat hőmérséklete jó közelítéssel azonos a kilépő levegő hőmérsékletével. A d – g kísérletekben – így a 100 °C belépő levegő hőmérséklet mellett is – a tartózkodási idő a szárítási zónában, igen rövid, 9,8 s. Fontos azonban megemlíteni, hogy a visszaoldott fehérjetartalom nem ad információt a makromolekula szerkezetében esetleg végbemenő változásokról.

#### Szárítási kísérletek PEG 6000 adalékanyag alkalmazásával

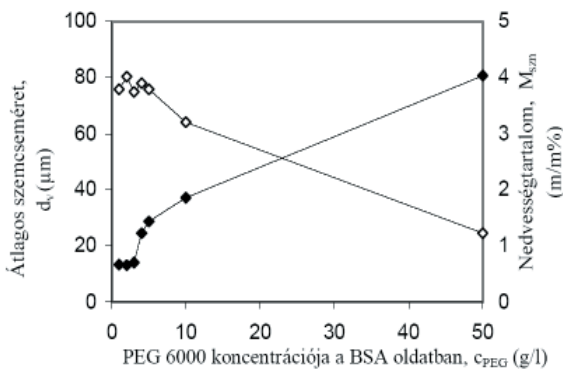
A PEG tartalmú BSA oldatokból kiinduló szárítási kísérletek körülményei megegyeztek az 1. Táblázatban feltüntetett e mérés körülményeivel, azzal a különbséggel, hogy a BSA oldatokhoz a szárítást megelőzően, különböző mennyiségű PEG 6000-t adtunk,  $c_{PEG} = 1, 2, 3, 4, 5, 10$  és  $50 \text{ g/l}$  PEG koncentrációk beállítására. A kísérleteket 60 °C hőmérsékletű szárítólevegővel végeztük, tekintettel a PEG 6000 olvadáspontjára (55-60 °C). A szárított termékek összetételét az egyes alkotók tömegarányának százalékában adtuk meg: polimer ( $c_{PEG,sz}$ ), oldható albumin ( $c_{BSA,sz}$ ), nedvesség ( $M_{szn}$ ) és a fehérje veszteségként jelentkező, vissza nem oldható fehérje ( $c_{BSA,v}$ ) alkotja a szárítványt. Ez utóbbi érték számítható az előző három paraméter ismeretében. A termékek összetételének alakulását a kiindulási oldatok PEG tartalmának függvényében a 3. Ábrán mutatjuk be.



3. Ábra. A termék összetételének változása a BSA oldathoz adott PEG 6000 mennyiségének függvényében.

A szárítás során végbemenő nedvességelvonás és/vagy hőhatás a fehérje szerkezetében változást idézhet elő, végbe mehet a fehérje irreverzibilis koagulációja, melynek következtében az albumin visszaoldása már nem lehetséges. A 3. Ábra adatai alapján a vissza nem oldható fehérjetartalom a szárítványokban 5 % alatt maradt, tehát a fehérje csak nagyon kissé megmaradt.

szenvedett, ill. a fehérjetartalom teljes mértékben visszaoldható volt. A termékek nedvességtartalma viszont jelentősen függ az oldatok kezdeti polimer tartalmától. A szemcseméret és a nedvességtartalom változását együtt mutatjuk be a 4. Ábrán. E két paraméter különösen a fehérjetartalom 10 %-ának megfelelő 4 g/l koncentrációtól kezdődően változik jelentősen. E koncentráció alatt (pl.  $c_{PEG} = 3$  g/l mind a szemcseméret ( $d_v = 14,08 \mu\text{m}$ ), mind pedig a nedvességtartalom ( $M_{szn} = 3,75$  m/m%) jó egyezést mutat az 1. Táblázatban rögzített, kizárólag BSA-t tartalmazó oldattal végzett e kísérlet szemcseméret és nedvességtartalom értékeivel, vagyis ilyen alacsony PEG koncentráció tartományban az adalékanyag nem befolyásolja jelentősen sem a szemcseméretet, sem a szárítmány nedvességtartalmát. A PEG-tartalom növelésével, 4g/l koncentráció felett azonban 10g/l koncentrációig gyorsabb, tovább növelve a PEG koncentrációt lassabb, de folyamatos nedvességtartalom csökkenés következik be.



4. Ábra A hozzáadott PEG 6000 mennyiségének hatása a termék szemcseméretére ( $\blacklozenge$ ),  $d_v$  ( $\mu\text{m}$ ) és nedvességtartalmára ( $\diamond$ ),  $M_{szn}$  (m/m%).

Hasonló, de ellentétes irányú a szemcseméret változása, amely 80  $\mu\text{m}$ -nél magasabb értéket ér el  $c_{PEG} = 50$  g/l koncentrációnál. A szemcseméret és a nedvességtartalom változásokat követve, a szárítási gyakorlatban szokatlan eredményt kaptunk. A bevonat vastagság növekedése, amely feltehetően a PEG koncentráció növekedésével esetünkben is bekövetkezik, általában együtt jár a szemcseméret, valamint a nedvességtartalom növekedésével. Az eredmények feltehetően a következő megmondolások alapján értelmezhetők. A PEG 6000, mint jó kiszóó anyag kis koncentrációban ( $c_{PEG} < 4$  g/l), jelen körülmények között nem fejt ki hatását. Növelve a PEG koncentrációt, megkezdődik a fehérje molekulákból a vízmolekulák "kiszorítása", hozzájárulva a rétegen átáramló levegő szárító hatásához. Ez azt jelenti, hogy a nedvességelvonás PEG kiszóó anyag jelenlétében gyorsabb, mint a nélkül. Ennek eredményeképpen valóban nedvességtartalom csökkenés következhet be a PEG koncentráció növelésével. A szemcseméret növekedés a fehérje és a kisebb méretű PEG molekulák összekapcsolódásával, a PEG molekuláknak a fehérje molekulákba való beépülésével magyarázható.

A vizsgálatok azt mutatják, hogy a fehérjéhez képest nagyobb mennyiségű (több mint 10 %) PEG 6000 használata esetén a termék nedvesség tartalma és szemcsemérete jelentős mértékben eltérhet az adalék nélküli, 60 °C-on történő szárítás eredményeihez képest. Viszont a visszaoldható fehérjetartalom a polimer jelenlétében, annak arányától függetlenül, még kedvezőbb értékeket is mutat. PEG jelenléte a termékben elősegíti a nem vizes közegű további

felhasználások esetén a fehérje diszpergálhatóságát és stabilitását szerves oldószerekben, mint például polimer-protein társított rendszerek előállításánál szabályozott hatóanyag leadás céljából.

### Köszönetnyilvánítás

A szerzők a kísérleti munkákat a GVOP-3.1.1.-2004-05-0031/3.0 sz. pályázat pénzügyi támogatásával végezték.

### Hivatkozások

- Orive, G.; Hernandez, R. M.; Gascon, A. R.; Dominguez-Gil, A.; Pedraz, J. L. *Curr. Opin. Biotech.* **2003**, *14*(6), 659-664.
- Suihko, E. J.; Forbes, R. T.; Apperley, D. C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25*(1), 105-112.
- Okamoto, H.; Todo, H.; Iida, K.; Danjo, K. *Powder Science and Technology in Japan* **2002**, *20*, 71-83.
- Wang, W. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 1-60.
- Maa, Y.-F.; Nguyen, P.-A.; Andya J. D.; Sweeney, T. D.; Shire, S. J.; Hsu, C. C. *Pharm. Res.* **1998**, *15*(5), 768-775.
- Mumenthaler, M.; Leuenberger, H. *In. J. Pharm.* **1991**, *72*(2), 97-110.
- Jono, K.; Ichikawa, H.; Miyamoto, M.; and Fukumori, Y. *Powder Technol.* **2000**, *113*, 269-277.
- Szentmarjay, T.; Pallai, E.; Szalay, A. *Drying Technol.* **1995**, *13*(5-7), 1203-1219.
- Szentmarjay, T., Szalay, A.; Pallai, E.; Bencze, T.; Vass, T. *Drying Technol.* **1996**, *14*(3-4), 501-512.
- Ingham, K. C. *Method Enzymol.* **1990**, *182*, 301-306.
- Vert, M.; Domurado, D. *J. Biomat. Sc.-Polym. E.* **2000**, *11*(12), 1307-1317.
- Szentmarjay, T.; Pallai, E.; Regényi, Zs. *Drying Technol.* **1996**, *14*(9), 2091-2115.

### Formation of bovine serum albumin microparticles by gentle drying

The aim of this study was to investigate the drying process of bovine serum albumin (BSA) in a laboratory scale mechanically spouted bed dryer for production of protein powders with a mean particle size of  $d_v < 10 \mu\text{m}$  and to preserve the protein content. Different solutions of BSA with and without excipient (polyethylene glycol,  $M_w = 6000$ , PEG 6000) were dried on inert particles to study the effect of process parameters and of excipient on the quality of the product.

The moisture removal of heat sensitive materials is rather difficult. Intensive, well controlled heat and mass transfer can be carried out in the so called „Mechanically Spouted Bed” (MSB) dryer in which the particle recirculation is ensured by an inner vertical houseless conveyor screw, as it can be seen in Fig. 1. By using inert packing, heat sensitive materials of high moisture content can be advantageously dried during very short time. In the MSB dryer the drying process is performed in a film-like thin layer formed on the surface of inert packing. Due to the large contact surface provided by the inert particles the heat and mass transfer processes of drying are very short (few seconds) even at relatively low wet bulb temperature. Therefore the moisture diffusion resistance in the very thin film-like coating can be considered negligible and the drying proceeds at „quasi constant” rate. This assures a very gentle drying, as well.

Protein requires special consideration in formulation since their biological efficiency tightly depends on their chemical and physical structure. Polyethylene glycols with different molecular weights

are favourable salting-out agent for separation and purification of proteins. The product gained by this method can contain in lower or higher ratio residual polyethylene glycol which can influence the further processes (e. g. the drying step) and the final solid properties. Polyethylene glycol was selected as an excipient and adding to the BSA solutions to be dried. The effect of the used PEG on the characteristics of the protein powder was investigated and compared with the results obtained with pure BSA.

The drying experiments were performed in an MSB-dryer with inert particles of laboratory size (See Fig. 2.). The dried product was characterized by the volume mean particle size ( $d_v$ ), the residual moisture content ( $M_{szn}$ , m/m%) and the protein preservation was expressed as the mass ratio of the soluble protein content in the dried product ( $c_{BSA,sz}$ ).

To achieve a favorable drying time the thickness of the coating have to adjust to an optimum value. The thickness of the coating affects not only the drying time, hereby the final moisture content, but also the final particle size of the dried product. The thickness of the coating can be regulate by the circulation rate of inert particles (by adjusting the rotation speed of the screw) and the feeding rate of the suspension. In our experiments the height of the inert particles and the inlet air flow were kept constant. The influence of the other process parameters on the main particle size and residual moisture content of the dried product, as well as the protein content preservation are shown in Table 1., in case of pure BSA solutions. The BSA concentration of the solutions was 40 g/l in each case, the feeding rate was  $q = 4.5$  or  $3 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  in runs **a – c** and **d – g**, respectively. It was found that the particle size particularly decreased by decreasing the rotation speed, but there is not much difference between the residual moisture content of these products (samples **a-c**).

To check the thickness of the coating under the experimental conditions demonstrated in Table 1. calculation was made on the basis of the equation. The thickness of the coating,  $\delta$  was found of 5,94  $\mu\text{m}$ .

The experiments were carried out in four different inlet air temperatures, samples **d–g**. It was found that the final moisture content depends considerably on the air temperature but it can be

hardly influenced by the mentioned other process parameters. This result is not so surprising since the temperature has in addition to its effect on the moisture removal a major influence on the structure and the composition of the protein molecules. At 100 °C, in run **g** the mean particle size of the product decreased below the demanded 10  $\mu\text{m}$ .

The acceptable protein preservation ( $c_{BSA,sz}$ ) can be explained by the relatively short residence time ( $\tau_{sz}$  values in Table 1.) in the drying zone.

The effect of PEG 6000 on the particle size, residual moisture and preserved soluble protein content of the product was also investigated. The experiments were carried under the same conditions as in run **e** for pure BSA shown in Table 1 but different amount of PEG 6000 was added to the BSA solution before drying to adjust the polymer concentration to  $c_{PEG} = 1, 2, 3, 4, 5, 10$  and 50 g/l. The composition of the dried products is shown in Fig. 3. The product consists of PEG ( $c_{PEG,sz}$ ), soluble protein ( $c_{BSA,sz}$ ), nonsoluble protein ( $c_{BSA,v}$ ) and moisture ( $M_{szn}$ ) content. It was found that the non-soluble protein content is lower than 5 %. The particle size and the residual moisture content depend significantly from PEG concentration of 4 g/l (i.e 10 % of the protein content) as it can be seen in Fig. 4. Under this concentration the particle size,  $d_v = 14.08 \mu\text{m}$  and also the residual moisture content,  $M_{szn} = 3,75 \text{ m/m}\%$  are similar to the values obtained in experiment **e** (pure BSA). The decrease of the residual moisture content can be explained by the higher salting-out effect of the higher PEG content which can aid the water removal from the protein. The agglomeration between the two macromolecules can result in bigger particle size of the dried product.

It can be concluded that usage of higher PEG 6000 than 10 % of the protein content in the BSA solutions to be dried causes considerable change in particle size and moisture content of the product. But the ratio of the soluble protein in product reaches higher values than in case of drying the pure BSA solutions. The presence of PEG in protein powders improves the dispersion rate and stability of proteins in organic media in further applications such as formation of polymer-protein composite particles for controlled drug delivery systems.