

KATARZYNA SAMBORSKA

## SUSZENIE ROZPYŁOWE ENZYMÓW – PRZYCZYNY INAKTYWACJI ORAZ METODY I MECHANIZMY ICH STABILIZACJI

### Streszczenie

Inaktywacja enzymów wywołana procesem suszenia oraz próby opisu jej przyczyn i mechanizmów są przedmiotem wielu publikacji naukowych. W niniejszym artykule przedstawiono analizę najważniejszych przyczyn inaktywacji oraz podano przykłady badań obrazujących opisane mechanizmy. Do przyczyn tych zaliczono: działanie podwyższonej temperatury, niekorzystny wpływ ubytku wody z układu, niekorzystny wpływ adsorpcji białek na powierzchni międzyfazowej oraz uszkodzenia mechaniczne. Opisano również, oraz zilustrowano przykładami, metody i mechanizmy stabilizacji aktywności enzymów w czasie suszenia rozpyłowego, takie jak: zastępowanie wody, stan szklisty oraz adsorpcja międzyfazowa.

**Słowa kluczowe:** suszenie rozpyłowe enzymów, przyczyny inaktywacji, mechanizmy stabilizacji

### Wprowadzenie

Preparaty enzymatyczne stanowią integralną część nowoczesnego przetwórstwa żywności. Enzymy są katalizatorami (biokatalizatorami) przemian chemicznych, wytwarzanymi przez żywe organizmy. Jedynie w ich obecności może zachodzić wiele reakcji metabolicznych we względnie łagodnych warunkach, tzn. w temperaturze poniżej 100 °C, przy ciśnieniu atmosferycznym i obojętnym pH [29]. Człowiek praktycznie wykorzystywał działanie enzymów na długo przed tym, zanim potrafił uzasadnić to naukowo. Pierwszym enzymem otrzymanym na skalę przemysłową dla przemysłu spożywczego była podpuszczka, uzyskana przez duńskiego naukowca Christiana Hansena w 1874 r. z żołądków cieląt i użyta w produkcji serów [17]. Na początku XXI w. trudno podać przykład produkcji żywności bez udziału preparatów enzymatycznych; wykorzystywanych jest ponad 100 znanych enzymów, a liczba ta każdego roku zwiększa się [19]. Zastosowanie preparatów enzymatycznych w praktyce jest szerokie, gdyż

obejmuje prawie wszystkie gałęzie przemysłu spożywczego. Najważniejsze korzyści płynące z zastosowania enzymów to: przyspieszenie procesów technologicznych, możliwość uruchomienia produkcji nowych asortymentów żywności (w tym żywności funkcjonalnej), podniesienie jakości i atrakcyjności oraz wydłużenie trwałości produktów żywnościowych, możliwość zwiększenia wydajności tradycyjnie stosowanych surowców i zmniejszenie kosztów produkcji [19, 25, 28].

Suszenie preparatów enzymatycznych jest jedną z metod ich utrwalania, prowadzącą do otrzymania suchych produktów wygodnych w dalszym obrocie i stosowaniu. Preparaty suszone charakteryzują się znacznie większą trwałością. Czas przechowywania preparatu o wysokiej aktywności może wynosić do kilku lat [20]. Niemniej jednak, parametry procesu suszenia powinny być starannie dobrane w celu uniknięcia degradacji enzymów, gdyż te, jako substancje białkowe, łatwo ulegają zmianom prowadzącym do utraty aktywności w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Zmniejszenie degradacji enzymów w czasie procesu suszenia rozpyłowego można osiągnąć również poprzez zastosowanie dodatku substancji stabilizujących.

### **Inne substancje o funkcjach enzymatycznych**

Większość enzymów ze źródeł naturalnych charakteryzuje się niską aktywnością i stabilnością, dlatego zaczęto je intensywnie udoskonalać i dostosowywać do potrzeb konkretnych procesów technologicznych. Osiągane jest to z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej lub na drodze chemicznej modyfikacji enzymów. W wyniku zastosowania tej ostatniej metody otrzymuje się synzimy, czyli enzymy semisyntetyczne. Do grupy tej zaliczane są także otrzymywane „w probówce” peptydy, których sekwencja i struktura przestrzenna wzorowana jest na fragmentach cząsteczek enzymów [8].

Oprócz substancji białkowych funkcje biokatalizatorów spełniają również substancje zbudowane z kwasu rybonukleinowego RNA (rybozomy) oraz przeciwciała o charakterze enzymatycznym (abzimy). Kwasy nukleinowe i pokrewne do nich związki najprawdopodobniej odgrywały rolę kluczowych biokatalizatorów podczas najwcześniejszych etapów ewolucji, jednak zostały zastąpione w jej kolejnych etapach przez enzymy [8, 30]. Abzimy od enzymów różni dużo mniejsza szybkość reakcji (zwykle 3 – 4 rzędy wielkości).

### **Rola wody w enzymach**

Woda w preparatach enzymatycznych może występować jako woda wolna lub związana. Wodę wykazującą ciśnienie pary równe ciśnieniu czystej wody nazywa się wodą wolną. Jej występowanie (jako rozpuszczalnik lub środowisko reakcji) jest warunkiem koniecznym do zachodzenia reakcji. Cząsteczki wody, ze względu na swój charakter dipolowy, tworzą wiązania wodorowe z grupami polarnymi makroczaście-

czek, tworząc dookoła nich warstwę hydratacyjną. Tę część wody, która występuje w postaci wody związanej, nazywa się wodą strukturalną. Woda związana wykazuje mniejsze ciśnienie pary niż ciśnienie nad wodą wolną w tej samej temperaturze [1].

Rola wody w strukturze biopolimerów, jakimi są też białka enzymatyczne, ma złożony charakter. Z jednej strony występowanie wody strukturalnej jest konieczne i pomocne w utrzymaniu natywnej aktywnej struktury makrocząsteczki. Z drugiej strony oddziaływanie woda – biopolimer określają ruchliwość makrocząsteczki w środowisku. Przy wysokiej aktywności wody zwiększona jest mobilność cząsteczek, prowadząca do zachodzenia zmian konformacyjnych powodujących denaturację białka, co jest związane z inaktywacją enzymów. Suszenie powoduje obniżanie aktywności wody w preparacie enzymatycznym, prowadzi do zmniejszenia mobilności cząsteczek i sprawia, że białko enzymatyczne jest mniej podatne na występowanie niekorzystnych zmian strukturalnych prowadzących do denaturacji. Jednak cząsteczki wody strukturalnej, niezbędne do utrzymania natywnej struktury makrocząsteczki, a usuwane stopniowo w czasie suszenia, muszą być zastąpione cząsteczkami innych substancji [10, 27].

### **Wpływ suszenia na aktywność enzymów**

Najbardziej rozpowszechnionym sposobem produkcji stałych preparatów enzymatycznych jest suszenie rozpyłowe. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie z tych względów, że można suszeniu poddawać preparaty płynne, proces jest wysokowydajny i ciągły oraz charakteryzuje się korzystnymi wskaźnikami ekonomicznymi. Bardzo ważne jest występowanie tzw. chłodzącego efektu odparowania, będącego skutkiem gwałtownego odparowania ze znacznie rozwiniętej powierzchni międzyfazowej dzięki rozpyleniu i pobierania przez parującą wodę ciepła przemiany fazowej. Efekt ten jest szczególnie istotny w przypadku suszenia materiałów termolabilnych, takich jak enzymy. Temperatura cząstek w czasie suszenia jest utrzymywana na stosunkowo niskim poziomie, nawet gdy zastosowana temperatura powietrza wlotowego jest wysoka. Przyjmuje się, że maksymalna temperatura cząstek w czasie suszenia jest równa temperaturze powietrza wylotowego, i że jest to temperatura, w której następuje odparowanie wody [14, 15, 23].

W literaturze z ostatnich lat podano szereg przykładów badań nad suszeniem różnych enzymów, w większości dotyczących suszenia rozpyłowego. Jako metodę porównawczą często przedstawia się suszenie sublimacyjne, korzystniejsze pod względem zachowania aktywności enzymów, lecz charakteryzujące się długim czasem i wysokimi kosztami prowadzenia procesu.

Devakate i wsp. [5] suszyli rozpyłowo i sublimacyjnie bromelainę wyekstrahowaną z owoców ananasa. Aktywność względna po suszeniu rozpyłowym wynosiła 78 %, a po suszeniu sublimacyjnym 95 %. Innym enzymem poddawany suszeniu

rozpyłowemu była dehydrogenaza alkoholowa, suszona w obecności trehalozy i substancji ochronnych [31]. Maksymalną aktywność względną, na poziomie 85 %, uzyskano po zastosowaniu dodatku  $\beta$ -laktoglobuliny i albuminy serum wołu. Samborska i Witrowa-Rajchert [21] suszyły rozpyłowo  $\alpha$ -amylazę z *Aspergillus oryzae* na nośniku maltodekstrynowym. Stwierdzono, że suszenie rozpyłowe jest odpowiednią metodą odwadniania tego enzymu, za pomocą której, pod warunkiem zastosowania odpowiednich parametrów procesu, możliwe jest otrzymanie preparatu enzymatycznego o wysokiej aktywności. Aktywność względną  $\alpha$ -amylazy w otrzymanych suszach wahała się od 56,7 do 90,1 %.

### **Przyczyny postępującej inaktywacji enzymów w czasie suszenia rozpyłowego**

Postępująca inaktywacja enzymów w czasie suszenia jest procesem bardzo złożonym, którego przyczyny i mechanizmy mają wieloraki charakter. Utrudnieniem w identyfikacji przyczyn stopniowej inaktywacji jest fakt, że wszystkie mechanizmy zachodzą w czasie procesu niemal równocześnie. Do podstawowych przyczyn inaktywacji można zaliczyć: działanie podwyższonej temperatury, ubytek wody strukturalnej z enzymu, niekorzystny wpływ adsorpcji białek na powierzchni międzyfazowej oraz uszkodzenia mechaniczne.

#### *Wpływ podwyższonej temperatury*

Główną przyczyną degradacji białek enzymatycznych w czasie suszenia jest działanie podwyższonej temperatury prowadzące do denaturacji. Denaturacja termiczna enzymów wynika ze zwiększonej ruchliwości atomów w podwyższonej temperaturze, powodującej rozrywanie wiązań stabilizujących strukturę przestrzenną białka oraz wytwarzanie połączeń, w wyniku których następuje przejście konformacji aktywnej cząsteczki w konformację nieaktywną.

W badaniach nad suszeniem rozpyłowym bromelainy wzrost temperatury powietrza wlotowego ze 100 do 160 °C (czemu odpowiadał wzrost temperatury powietrza wylotowego z 40 do 60 °C) spowodował zmniejszenie aktywności względnej enzymu z 78 do 22 % [5]. Yoshii i wsp. [31], po podwyższeniu temperatury powietrza wlotowego w czasie suszenia rozpyłowego dehydrogenazy alkoholowej z 70 do 110 °C, wykazali zmniejszenie aktywności względnej enzymu z 85 do 30 %. Aktywność względną transglutaminazy ze *Streptococcus hygroscopicus* WSH03-13 wynosiła 89,6 % po suszeniu rozpyłowym w temp. powietrza wylotowego 60 °C, a po wzroście do 70 °C zmniejszyła się do 60,1 %. W obu przypadkach enzym suszono w 20 % roztworze maltodekstryny z dodatkiem 0,1 % glutationu [4]. Samborska i Witrowa-Rajchert [21] przedstawiły nieco odmienną zależność między temperaturą suszenia rozpyłowego a aktywnością względną suszonego enzymu. Zwiększanie intensywności

suszenia poprzez podwyższanie temperatury suszenia z 160 do 220 °C (przy zastosowaniu strumienia surowca 1,2 i 1,7 cm<sup>3</sup>/s) prowadziło do zwiększenia aktywności względnej  $\alpha$ -amylazy. Tłumaczono to szybszym osiągnięciem zwiększonej termoodporności enzymu w środowisku o małej zawartości wody. Jednak zależność ta była widoczna jedynie do osiągnięcia zawartości wody na poziomie 0,07 g H<sub>2</sub>O/g s.s., kiedy to dalsze suszenie nie prowadziło do zwiększania aktywności względnej. Prawdopodobnie wywołane to było usunięciem wody strukturalnej stabilizującej cząsteczkę białka.

#### *Wpływ ubytku wody*

Bardzo ważną rolę w stabilizacji cząsteczek białek enzymatycznych pełni woda strukturalna. Dlatego też proces suszenia enzymów powinien być prowadzony tak, aby usuwana była wyłącznie woda wolna, a woda strukturalna, odpowiadająca za utrzymanie natywnej struktury makrocząsteczek, pozostała nienaruszona.

Liao i wsp. [11], susząc rozpyłowo lizozym, stwierdzili, że główną przyczyną denaturacji w czasie procesu jest ubytek wody. Za krytyczną zawartość wody, przy której rozpoczynają się niekorzystne zmiany konformacyjne, uznano 22 %. W badaniach Samborskiej i Witrowej-Rajchert [21] stwierdzono, że głównym parametrem decydującym o końcowej aktywności względnej  $\alpha$ -amylazy suszonej rozpyłowo jest końcowa zawartość wody w suszu. Szybkie odparowanie wody, jakie następuje w czasie suszenia rozpyłowego, było korzystne ze względu na wzrost odporności enzymu na podwyższoną temperaturę, jednak nie może ono prowadzić do zbyt dużego stopnia wysuszenia, ponieważ może naruszyć strukturę białka enzymu w wyniku ubytku wody strukturalnej. Zawartość wody gwarantującą uzyskanie maksymalnej aktywności względnej  $\alpha$ -amylazy w suszu nazwano optymalną zawartością wody w preparacie enzymatycznym. Przy poziomie wody 6,5 do 8,2 % w preparacie enzymatycznym nie obserwowano niekorzystnego wpływu ubytku wody na konfigurację przestrzenną białka. Temperatura powietrza wylotowego powinna wynosić 70 – 80 °C, aby otrzymać susz o takiej zawartości wody.

#### *Wpływ adsorpcji międzycząsteczkowej*

Jedną z możliwych przyczyn degradacji enzymów w czasie suszenia rozpyłowego są zmiany konformacyjne struktury wtórnej białek, wynikające z adsorpcji enzymu na powierzchni kropel [12, 14]. Millqvist-Fureby i wsp. [14], susząc rozpyłowo trypsynę w obecności różnych sacharydów i substancji powierzchniowo czynnych, obserwowali korelację między ilością trypsyny zaadsorbowanej na powierzchni suszonych cząstek a aktywnością względną enzymu. Jednak stopień degradacji był również zależny od rodzaju użytej substancji stabilizującej oraz stężenia enzymu. Przykładowo, po zastosowaniu laktozy zwiększenie akumulacji białka enzymatycznego na powierzchni czą-

stek z 4 do 26 % spowodowało zmniejszenie aktywności enzymu z 93 do 83 %. Natomiast zmniejszenie adsorpcji enzymu po zastosowaniu dekstryny wywołało zmniejszenie aktywności enzymu zaledwie o 3 %.

Poza niekorzystnym wpływem powierzchniowej adsorpcji na strukturę cząsteczek enzymów, gromadzenie się ich na powierzchni kropel powoduje, że są one bardziej narażone na działanie podwyższonej temperatury oraz sił ścinających w czasie rozpylania.

#### *Wpływ uszkodzeń mechanicznych*

Podczas suszenia rozpyłowego płynnych preparatów enzymatycznych niekorzystnym czynnikiem jest działanie naprężeń ścinających w czasie procesu rozpylania. W wyniku ich działania może nastąpić niszczenie struktury cząsteczek enzymu. Intensywność naprężeń ścinających zależy od parametrów rozpylania: rodzaju rozpylacza, ciśnienia powietrza w dyszy rozpylającej, szybkości zasilania surowcem, a także od właściwości suszonego płynnego preparatu: lepkości i napięcia powierzchniowego [14, 16].

### **Metody i mechanizmy stabilizacji**

#### *Wpływ zastępowania wody*

Występowanie wody strukturalnej w cząsteczkach białek o aktywności enzymatycznej jest niezbędne do utrzymania ich natywnej struktury. W celu zmniejszenia negatywnych skutków ubytku wody w czasie suszenia dodaje się substancje, których cząsteczki mają zdolność zastąpienia wody związanej. Zastępowanie wody substancjami stabilizującymi może w znacznym stopniu zrekompenzować efekt inaktywacji dehydratacyjnej enzymów [3, 27]. Do takich substancji można zaliczyć: oligo- i polisacharydy (np. sacharoza, trehaloza, laktoza), alkohole wielowodorotlenowe (np. glicerol, sorbitol), a także białka innego rodzaju. Tworzą one wiązania wodorowe z białkiem enzymu, zastępując w nim cząsteczki wody związanej. Dodatek cukrów wzmacnia również interakcje hydrofobowe między grupami niepolarnymi, które uważane są za bardzo istotne czynniki stabilizujące strukturę białka. Efekt ochronny dodatków zależy od zastosowanego stężenia substancji stabilizującej. Zbyt duże stężenie może wywoływać efekt odwrotny i powodować zwiększoną degradację enzymu [9, 15].

Liao i wsp. [11], susząc rozpyłowo lizozym w obecności sacharozy i trehalozy, stwierdzili, że zastępowanie cząsteczek wody na powierzchni białka jest głównym mechanizmem działania ochronnego tych cukrów. Suszenie rozpyłowe trypsyny z dodatkiem mannitolu, sacharozy, laktozy oraz dekstryny i cyklodekstryny wykazało, że mannitol i sacharoza charakteryzują się mniej znaczącym efektem ochronnym niż po-

zostałe substancje [14]. Badania nad suszeniem  $\alpha$ -amylazy z *Aspergillus oryzae* w obecności sacharozy, sorbitolu i glicerolu przeprowadzone przez Samborską i wsp. [22] wykazały, że zastosowanie sorbitolu i glicerolu w odpowiedniej dawce (100 mg/ml sorbitolu, 8,1 % glicerolu) może być metodą zmniejszenia degradacji tego enzymu w czasie suszenia rozpyłowego. Sacharoza zastosowana w mniejszym stężeniu (140 mg/ml) nie wpłynęła na zmianę aktywności względnej enzymu w porównaniu z suszeniem bez dodatku, a wyższy jej dodatek (705 mg/ml) spowodował znaczne obniżenie aktywności względnej.

#### *Wpływ stanu szklistego*

Wiele cukrów (zarówno polisacharydów o długich łańcuchach, np. maltodekstryna, jak i niskocząsteczkowych, np. trehaloza) w stanie amorficznym wytworzonym w czasie suszenia charakteryzuje się właściwościami szklisto-twórczymi. Stan szklisty wyróżnia się bardzo wysoką lepkością, rzędu  $10^{12}$  Pa·s, i znacznie ograniczoną ruchliwością cząsteczek [18]. Denaturacja (inaktywacja) białek enzymatycznych jest wynikiem zmian w konformacji przestrzennej, dlatego też stan szklisty, w którym możliwość zajścia tych zmian jest znacznie ograniczona, wpływa korzystnie na stabilność enzymów. Konieczny jest zatem dodatek stabilizatora szklistotwórczego do roztworu enzymu poddawanego suszeniu [2, 7, 13, 24]. Najczęściej stosowanymi substancjami szklisto-twórczymi są dwucukry (sacharoza, trehaloza) i polisacharydy (maltodekstryna).

Potwierdzeniem pozytywnego wpływu suszenia na nośniku maltodekstrynowym na zachowanie aktywności enzymu mogą być badania suszenia rozpyłowego transglutaminazy ze *Streptococcus hygroscopicus* WSH03-13 [4]. Aktywność względna enzymu suszonego w temp. powietrza wylotowego 60 °C wynosiła 24,5 %. Dodatek 20 % maltodekstryny pozwolił na zmniejszenie inaktywacji i osiągnięcie aktywności względnej 80,4 %. Devakate i wsp. [5] za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) badali temperaturę przemiany szklistej suszonej bromelainy i stwierdzili, że w celu uniknięcia zmian strukturalnych i denaturacji enzymu temp. powietrza wylotowego podczas suszenia powinna być niższa niż 61 °C.

W przypadku stabilizatorów, które w czasie zmniejszania zawartości wody mogą występować zarówno w stanie amorficzno-szklistym, jak i krystalicznym ważne jest, aby znacznie przeważał udział fazy szklistej. Millqvist-Fureby i wsp. [14] wykazali, że istnieje odwrotnie proporcjonalna zależność między stopniem krystalizacji składników mieszaniny a aktywnością względną suszonej rozpyłowo trypsyny. Autorzy ci stwierdzili, że występowanie sacharozy w stanie krystalicznym powoduje wykluczanie trypsyny z wnętrza kropeł. Równocześnie zwiększa się jej gromadzenie na powierzchni, co wywołuje zwiększone zmiany w strukturze enzymu prowadzące do denaturacji. Suzuki i wsp. [26] badali wpływ stężenia sacharozy oraz stopnia jej krystalizacji na



stabilność dehydrogenazy mleczanowej suszonej sublimacyjnie w czasie przechowywania. Enzym suszony bez dodatku sacharozy po 5 dniach przechowywania miał aktywność względną na poziomie 46 %. Po takim samym okresie enzym suszony z dodatkiem 30 mg sacharozy w stanie krystalicznym wykazał podobną aktywność, na poziomie 52 %. Dodatek amorficznej sacharozy w ilościach: 4 i 10 mg miał znacząco stabilizujący wpływ i aktywność po przechowywaniu wynosiła odpowiednio 85 i 97 %. Dalszy wzrost stężenia amorficznej sacharozy do 20 lub 30 mg nie powodował dalszej stabilizacji enzymu, którego aktywność wynosiła odpowiednio 63 i 46 %. Autorzy tłumaczą tę zależność szybką krystalizacją sacharozy w dwóch wyższych stężeniach oraz niekorzystnym wpływem stanu krystalicznego, ze względu na jego mniejszą podatność do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczką białka.

#### *Wpływ adsorpcji*

Jedną z możliwych przyczyn inaktywacji enzymów w czasie suszenia rozpyłowego są zmiany konformacyjne struktury wtórnej białek wynikające z adsorpcji enzymu na powierzchni kropeł stabilizatora. Zmniejszenie adsorpcji można osiągnąć przez dodatek substancji, które będą wypierały enzym z powierzchni międzyfazowej, np. środków powierzchniowo czynnych lub białek konkurujących z enzymem o miejsce na powierzchni kropeł [12, 14]. Prowadzone są również badania nad mikrokapsułkowaniem białek w kapsułkach utworzonych z dwóch wzajemnie niemieszających się cieczy [6]. Wypieranie enzymów z powierzchni kropeł zmniejsza nie tylko możliwość zachodzenia zmian strukturalnych, lecz również ogranicza ilość enzymu narażonego na działanie sił ścinających oraz podwyższonej temperatury.

Suszenie rozpyłowe dehydrogenazy alkoholowej w obecności trehalozy,  $\beta$ -laktoglobuliny, albuminy serum wołu oraz środka powierzchniowo czynnego Tween 80 przeprowadzili Yoshii i wsp. [31]. Enzym suszony jedynie z dodatkiem 30 % trehalozy miał aktywność względną na poziomie 43 %. Dodatek białek do roztworu enzymu suszonego powodował liniowy wzrost aktywności względnej enzymu aż do stosunku masowego 1:1, przy którym ta zależność była już liniowa. Wówczas odnotowano maksymalną wartość aktywności względnej enzymu na poziomie 85,5 %, która była niezależna od rodzaju białka. Natomiast dodatek środka powierzchniowo czynnego Tween 80 spowodował wzrost aktywności względnej dehydrogenazy alkoholowej o 10 %.

#### **Podsumowanie**

Enzymy, jako substancje białkowe, łatwo ulegają denaturacji w niekorzystnych warunkach, jakie panują w środowisku podczas suszenia rozpyłowego. Denaturacja białek enzymatycznych jest związana ze zmianami w strukturze natywnej, które prowadzą do utraty aktywności enzymatycznej. Zmiany te mogą być wywołane zarówno działaniem podwyższonej temperatury, jak i ubytkiem wody oraz działaniem sił ścina-



jących. Szczególną rolę w stabilizacji struktury enzymów pełni woda strukturalna. Występowanie w cząsteczce enzymu wody strukturalnej jest konieczne, aby cząsteczka utrzymała swoją aktywną konfigurację przestrzenną. Jeżeli woda ta jest usuwana w czasie suszenia, to w celu uniknięcia denaturacji konieczne jest jej zastąpienie substancjami stabilizującymi strukturę wtórną białek enzymatycznych poprzez tworzenie wiązań wodorowych i inne interakcje. Do substancji takich zalicza się m.in. cukry i alkohole wielowodorotlenowe. Innym sposobem stabilizacji struktury enzymów jest wytworzenie w czasie procesu suszenia stanu szklistego, w którym możliwość występowania zmian konformacyjnych jest znacznie ograniczona. Najpopularniejszą substancją szklisto-twórczą stosowaną w czasie suszenia jest maltodekstryna.

### Literatura

- [1] Brennan J.G.: Spray drying. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Eds. B Caballero, LC Trugo, PM Finglas. Academic Press Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, 2003.
- [2] Cardona S., Schebor C., Buera M.P., Karel M., Chirife J.: The thermal stability of invertase in reduced-moisture amorphous matrices in relation to glassy state of trehalose. *J. Food Sci.*, 1997, **62**, 105-112.
- [3] Carpenter J.F., Crowe J.H.: An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 1989, **28**, 3916-3922.
- [4] Cui L., Zhang D., Huang L., Liu H., Du G., Chen J.: Stabilization of a new microbial transglutaminase form *Streptomyces hydroscopius* WSH03-13 by spray drying. *Proc. Biochem.*, 2006, **41**, 1427-1431.
- [5] Devakate R.V., Patil V.V., Waje S.S., Thorat B.N.: Purification and drying of bromelain. *Sep. Pur. Technol.*, 2009, **64**, 259-264.
- [6] Elversson J., Millqvist-Fureby A.: Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein. *Int. J. Pharmac.*, 2005, **294**, 73-87.
- [7] Franks F., Hatley R., Mathias S.: Materials science and the production of shelf-stable biologicals. *BioPharm* 1991, **4**, 38-55
- [8] Kalinowska H., Buchowiecka A., Bielecki S.: Biokataliza. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2007, **56 (3-4)**, 327-334
- [9] Klibanov A.M.: Thermostabilisation of enzymes. *Adv. App. Microbiol.*, 1983, **29**, 1-29.
- [10] Lewicki P.P.: Water as a determinant of food engineering properties. A review. *J. Food Eng.*, 2004, **61 (4)**, 483-495.
- [11] Liao Y-H., Brown M.B. Nazir T., Quader A., Martin G.P.: Effects of sucrose and trehalose on the preservation of the native structure of spray-dried lysozyme. *Pharm. Res.*, 2002, **19 (12)**, 1847-1853.
- [12] Maa, Y.F., Nguyen, P.A., Hsu, S.W.: Spray-drying of air-liquid interface sensitive recombinant human growth hormone. *J. Pharm. Sci.*, 1998, **87**, 152-159.
- [13] Mazzobre M.F., Buera M.P., Chirife J.: Protective role of trehalose on thermal stability of lactase in relation to its glass and crystal forming properties and effect of delaying crystallization. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, **30**, 324-329.
- [14] Millqvist-Fureby A., Malmsten M., Bergenstahl B.: Spray-drying of trypsin – surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharm.*, 1999, **188**, 243-253.

- [15] Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G.: Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microb. Meth.*, 2006, **66**, 183-193.
- [16] Ohtake S., Martin R.A., Yee L., Chen D., Kristensen D.D., Lechuga-Ballesterosa D., Truong-Lea V.: Heat-stable measles vaccine produced by spray drying. *Vaccine*, 2010, **28**, 1275-1284.
- [17] Olempska-Beer Z.S., Merker R.I., Ditto M.D., DiNovi M.J.: Food-processing enzymes from recombinant microorganisms - a review. *Reg. Toxic. Pharmac.*, 2006, **45**, 144-158.
- [18] Pałacha Z., Sitkiewicz I.: Temperatura przemiany szklistej – parametr stabilności żywności. *Przem. Spoż.*, 2008, **62 (9)**, 32-37.
- [19] Praca zbiorowa. Enzymatyczna modyfikacja składników żywności (red. E. Kołakowski, W. Bednarski, S. Bielecki). Wyd. AR w Szczecinie, Szczecin 2005.
- [20] Rosiński M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R. Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **3 (44)**, 5-22.
- [21] Samborska K., Witrowa-Rajchert D.: Enzyme spray drying. The influence of water content on  $\alpha$ -amylase activity. *Inż. Chem. Proc.*, 2006, **27**, 559-565.
- [22] Samborska K., Wronka M., Witrowa-Rajchert D.: Wpływ dodatków stabilizujących na degradację preparatu  $\alpha$ -amylazy w czasie suszenia rozpyłowego. *Mat. VII Konferencji Naukowej „Jakość i bezpieczeństwo żywności”*, Warszawa 2009, s. 84.
- [23] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe w przemyśle spożywczym. *Post. Techn. Przem. Spoż.*, 2008, **1**, 63-69.
- [24] Schebor C, Buera M.P, Chirife J.: Glassy state in relation to the thermal inactivation of the enzyme invertase in amorphous dried matrices of trehalose, maltodextrin and PVP. *J. Food Eng.* 1996, **30**, 269-282.
- [25] Shahidi F., Janak K.: Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 2001, **12**, 435-464.
- [26] Suzuki T., Imamura K., Fujimoto H., Okazaki M.: Role of sucrose-LDH hydrogen Bond for thermal stabilizing effect on freeze-dried LDH. *Drying Technol.* 1999, **17 (7-8)**, 1429-1439.
- [27] Terebiznik M.R., Buera M.P., Pilosof A.M.R.: Thermal stability of dehydrated  $\alpha$ -amylase in trehalose matrices in relation to its phase transitions. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1997, **30**, 513-518.
- [28] Warchalewski J.R.: Zastosowanie enzymów w produkcji żywności na przełomie wieków. *Przem. Spoż.*, 2001, **55 (8)**, 40-44.
- [29] Whitaker J.R.: Enzymes – functions and characteristics. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Eds. B Caballero, LC Trugo, PM Finglas. Academic Press Elsevier Science Ltd., Oxford, UK, 2003.
- [30] Wróblewska B., Kostyra H.: Immunologia żywności. *Przem. Spoż.*, 2000, **54 (5)**, 8-10.
- [31] Yoshii H., Buche F., Takeuchi N., Terrol C., Ohgawara M., Furuta T.: Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *J. Food Eng.*, 2008, **87**, 34-39.

#### **SPRAY-DRYING OF ENZYMES: CAUSES OF INACTIVATION, METHODS AND MECHANISMS OF STABILIZING THEM**

##### **S u m m a r y**

Enzyme inactivation generated by the spray drying process and attempts to describe both the possible causes and the mechanisms thereof constitute a subject matter of many scientific papers. In the present

paper, the analysis of the most important causes of inactivation is presented, and some examples are given to illustrate the mechanisms described. The causes of inactivation include: impact of increased temperature, adverse effect of removing water from the system, adverse effect of protein adsorption on interfacial surface, and mechanical damages. Some methods and mechanism applied to stabilize the enzyme activity during spray-drying are described and exemplified, such as: water replacement, glassy state, and interfacial adsorption.

**Key words:** spray-drying of enzymes, causes of inactivation, stabilization mechanisms ☒