

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 320**

51 Int. Cl.:

**F26B 3/08** (2006.01)

**B01J 8/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07802497 .3**

96 Fecha de presentación: **06.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2054687**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PREPARACIONES DE HIDROFOBINA SECAS DE FLUJO LIBRE.**

30 Prioridad:  
**15.08.2006 EP 06118947**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2012**

73 Titular/es:  
**BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:  
**SCHÖNHERR, Michael;**  
**FAUST, Tillmann;**  
**RICHTER, Ulrike;**  
**SUBKOWSKI, Thomas y**  
**KAROS, Marvin**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 374 320 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la producción de preparaciones de hidrofobina secas de flujo libre

Descripción de la invención

5 La invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de preparaciones de hidrofobina secas, de flujo libre, estables, mediante pulverización de una disolución acuosa de hidrofobina en un dispositivo de pulverización.

10 El aislamiento de hidrofobinas tiene lugar habitualmente como disolución acuosa. En esta forma, las hidrofobinas pierden su actividad o experimentan descomposición microbiana y sólo pueden almacenarse y transportarse con un gran despliegue. Por tanto es deseable producir preparaciones secas de hidrofobinas, que contengan la hidrofobina en forma concentrada con una pérdida lo menor posible de su acción específica. Además estas preparaciones deben estar compuestas por partículas de superficie bien configurada con un tamaño de grano de desde 50 hasta 600 µm, de modo que en la industria de transformación se garantice una mezcla homogénea de estos productos con otras sustancias o una buena aplicabilidad.

Existen diferentes procedimientos de pulverización para eliminar el agua de medios acuosos que contienen enzimas.

15 En la patente estadounidense 4.617.272 se pulverizan medios que contienen enzimas sobre partículas inertes calentadas en un lecho fluidizado.

Como partículas inertes adecuadas se mencionan poliolefinas, policarbonatos, poli(metacrilatos de metilo) o poliestireno.

20 Una desventaja de este procedimiento es que los polvos secos de enzimas producidos por medio de estas partículas inertes no pueden utilizarse en la industria de la alimentación y de los piensos.

Según otro procedimiento, que se describe en la patente DD 263 790, se producen productos de proteasas de coagulación de la leche pulverizando disoluciones acuosas de proteasa sobre vehículos que se encuentra en una granuladora de lecho fluidizado. Como vehículos se describen leche desnatada en polvo y/o sustancias que contienen dextrina.

25 Aunque los productos obtenidos tienen una buena estabilidad enzimática y fluencia y los vehículos usados son fisiológicamente compatibles, este procedimiento tiene la desventaja de que debe utilizarse hasta 10 veces la cantidad de vehículos con respecto a la materia sólida de enzima.

30 El documento EP 522269 describe un procedimiento para la producción de preparaciones enzimáticas secas, de flujo libre, estables, mediante pulverización de disoluciones acuosas enzimáticas que contienen dado el caso aditivos en un dispositivo de pulverización, caracterizado porque se pulveriza la disolución enzimática usando conjuntamente desde el 5 hasta el 60% en peso, con respecto al contenido en sólidos de enzima de la disolución, de un agente auxiliar de pulverización, compuesto por ácido silícico hidrófobo y/o una sal metálica de un ácido graso superior a de 0 a 50°C y se secan las partículas así obtenidas, cargadas con agente auxiliar de pulverización.

35 La invención se basa por tanto en el objetivo de proponer un procedimiento que permita transformar disoluciones acuosas de hidrofobina en preparaciones de hidrofobina secas estables, que puedan utilizarse en la industria de transformación.

40 Se encontró un procedimiento para la producción de preparaciones de hidrofobina secas, de flujo libre, estables, mediante pulverización y secado de disoluciones acuosas de hidrofobina que contienen dado el caso aditivos en un dispositivo de pulverización, caracterizado porque la pulverización tiene lugar a una temperatura de aire de entrada de entre 120 y 200°C y/o porque la pulverización tiene lugar a una temperatura de aire de salida de entre 50 y 120°C.

45 Se encontró ahora que el procedimiento definido al principio conduce a preparaciones de hidrofobina especialmente muy adecuadas, cuando se pulveriza la disolución acuosa de hidrofobina que contiene dado el caso aditivos usando conjuntamente desde el 5 hasta el 200% en peso, con respecto al contenido en sólidos de hidrofobina de la disolución, de un agente auxiliar de pulverización, compuesto por uno o varios alcoholes de azúcar y se secan las partículas así obtenidas, cargadas con agente auxiliar de pulverización.

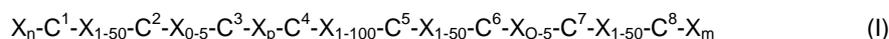
Las hidrofobinas son proteínas pequeñas de aproximadamente 100 aa, que son características de los hongos filamentosos y no aparecen en otros organismos. Recientemente se descubrieron proteínas similares a la

hidrofobina en *Streptomyces coelicolor*, que se denominan "chaplinas" y también tienen propiedades altamente tensioactivas. En las superficies límite agua/aire pueden ensamblarse las chaplinas para dar fibrillas similares a amiloide (Classen *et al.* 2003 Genes Dev 1714-1726; Elliot *et al.* 2003, Genes Dev. 17, 727-1740).

5 Las hidrofobinas están distribuidas, en una forma insoluble en agua, por la superficie de diferentes estructuras fúngicas, tales como por ejemplo micelio aéreo, esporas, cuerpos fructíferos. Los genes para hidrofobinas pudieron aislarse a partir de ascomicetos, deuteromicetos y basidiomicetos. Algunos hongos contienen más de un gen de hidrofobina, por ejemplo *Schizophyllum commune*, *Coprinus cinereus*, *Aspergillus nidulans*. Al parecer están implicadas diferentes hidrofobinas en diferentes estados del desarrollo fúngico. Las hidrofobinas son a este respecto presumiblemente responsables de diferentes funciones (van Wetter *et al.*, 2000, Mol. Microbiol., 36, 201-210; Kershaw *et al.* 1998, Fungal Genet. Biol, 1998, 23, 18-33).

Descripción de la invención

Hidrofobinas especialmente muy adecuadas para el procedimiento según la invención son polipéptidos de fórmula estructural general (I)

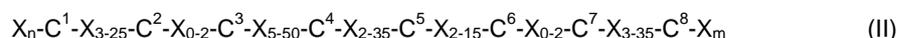


15 en la que X puede representar cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) y los índices que se encuentran junto a la X representan el número de aminoácidos, representando los índices n y m números entre 0 y 500, preferiblemente entre 15 y 300, p representa un número entre 1 y 250, preferiblemente 1-100, y C representa cisteína, alanina, serina, glicina, metionina o treonina, representando al menos cuatro de los restos designados con C cisteína, con la condición de que al menos una de las secuencias peptídicas abreviadas como X<sub>n</sub> o X<sub>m</sub> o X<sub>p</sub> represente una secuencia peptídica de al menos 20 aminoácidos de longitud, que no está unida de manera natural con una hidrofobina, que tras el recubrimiento de una superficie de vidrio provocan una modificación del ángulo de contacto de al menos 20°.

25 Los aminoácidos designados con C<sup>1</sup> a C<sup>8</sup> son preferiblemente cisteínas; pero también pueden sustituirse por otros aminoácidos con una ocupación de espacio similar, preferiblemente por alanina, serina, treonina, metionina o glicina. Sin embargo, al menos cuatro, preferiblemente al menos 5, de manera especialmente preferible al menos 6 y en particular al menos 7 de las posiciones C<sup>1</sup> a C<sup>8</sup> deben estar compuestas por cisteínas. Las cisteínas en las proteínas según la invención pueden o bien encontrarse en forma reducida o bien formar entre sí puentes disulfuro. Se prefiere especialmente la formación intramolecular de puentes C-C, en particular aquéllos con al menos uno, preferiblemente 2, de manera especialmente preferible 3 y de manera muy especialmente preferible 4 puentes disulfuro intramoleculares. En el caso del intercambio descrito anteriormente de cisteínas por aminoácidos con una ocupación espacial similar se intercambian por pares ventajosamente aquellas posiciones C que pueden formar entre sí los puentes disulfuro intramoleculares.

35 En caso de que en las posiciones designadas con X se usen también cisteínas, serinas, alaninas, glicinas, metioninas o treoninas, puede modificarse la numeración de las posiciones C individuales en la fórmula general de manera correspondiente.

Polipéptidos especialmente ventajosos son aquéllos de fórmula general (II)



40 en la que X puede representar cualquiera de los 20 aminoácidos que se producen de manera natural (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) y los índices que se encuentran junto a la X representan el número de aminoácidos, representando los índices n y m números entre 2 y 300 y C representa cisteína, alanina, serina, glicina, metionina o treonina, representando al menos cuatro de los restos designados con C cisteína, con la condición de que al menos una de las secuencias peptídicas abreviadas como X<sub>n</sub> o X<sub>m</sub> represente una secuencia peptídica de al menos 35 aminoácidos de longitud, que no está unida de manera natural con una hidrofobina, que tras el recubrimiento de una superficie de vidrio provocan una modificación del ángulo de contacto de al menos 20°.

50 El origen de las hidrofobinas no desempeña a este respecto ningún papel. Así pudieron aislarse las hidrofobinas por ejemplo a partir de microorganismos tales como, por ejemplo, bacterias, levaduras y hongos. En particular las hidrofobinas que se obtuvieron por medio de organismos modificados mediante ingeniería genética se tienen en cuenta según la invención.

Como aditivos, que pueden añadirse a la disolución acuosa de hidrofobina se tienen en cuenta materiales convencionales, preferiblemente fisiológicamente inocuos.

A éstos pertenecen polisacáridos, tales como compuestos de celulosa, pectinas y almidones de diferente origen, coloides formadores de película tales como gelatinas, caseína o albúmina, mono o disacáridos tales como glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa, o productos vegetales tales como por ejemplo harina forrajera de trigo o harina de soja.

- 5 Además pueden usarse como aditivos materiales inorgánicos tales como carbonato de calcio, tierras arcillosas, diferentes formas de silicatos y ácidos silícicos minerales o precipitados, pero también productos de origen animal, tal como por ejemplo harina de cáscara de huevo. Además pueden usarse además aditivos adicionales tales como emulsionantes, antioxidantes o conservantes.

La cantidad de los aditivos utilizados asciende por regla general a del 5 al 200% en peso, preferiblemente del 20 al 200% en peso, con respecto a la materia sólida de hidrofobina.

- 10 El procedimiento según la invención puede realizarse de la siguiente manera:

- 15 El agente auxiliar de pulverización se introduce junto con aire o un gas inerte mediante pulverización en un dispositivo de pulverización, preferiblemente una torre de pulverización. El suministro del agente auxiliar de pulverización tiene lugar convenientemente por encima de la unidad de atomización. Como torres de pulverización se tienen en cuenta todas las formas de realización conocidas por el experto (véase por ejemplo K. Masters, Spray Drying Handbook, ISBN 0-582-06266-7).

- 20 La disolución acuosa de hidrofobina puede introducirse a presión mediante boquillas en la cámara de pulverización cargada con agente auxiliar de pulverización. Pero también es posible dejar fluir la disolución acuosa de hidrofobina sobre discos de atomización de rotación rápida. La configuración de la unidad de atomización no tiene una influencia decisiva sobre el producto. También pueden utilizarse dispositivos de atomización conocidos por el experto adicionales (véase por ejemplo Arthur H. Levevre, Atomization and Sprays, ISBN 0-89116-603-3).

El cono de pulverización que se forma contiene una pluralidad de gotitas pequeñas, que a continuación se transforman mediante desecación en una preparación de hidrofobina seca. El secado tiene lugar de manera conveniente directamente tras la pulverización. Para esto es adecuado el secado por evaporación, en el que se elimina el agua de las gotitas con ayuda de un flujo de aire o de gas inerte calentado.

- 25 De manera especialmente preferible puede usarse para el secado un lecho fluidizado, que se encuentra por debajo de la unidad de atomización o en la zona de la unidad de atomización. El lecho fluidizado puede hacerse funcionar o bien como componente integral de una torre de pulverización (por ejemplo, la tecnología FSD de la empresa Niro o la tecnología SBD de la empresa Anhydro) o bien se utiliza una tecnología de secado conocida por el experto como granulación por pulverización en lecho fluidizado y explicada por ejemplo por Hans Uhlemann y Lothar Mörl en el libro "Wirbelschicht-Sprühgranulation", ISBN 3-540-66985-x.
- 30

En el caso de las hidrofobinas especialmente sensibles a la oxidación se prefiere el uso de gas inerte, tal como por ejemplo nitrógeno, durante la pulverización y el secado.

- 35 Las preparaciones de hidrofobina producidas con este procedimiento se caracterizan por su buena estabilidad y por un contenido en humedad residual reducido. La humedad residual asciende a menos del 10%, con respecto a la sustancia sólida, medida según la titulación de Karl-Fischer, preferiblemente es inferior al 7%, se prefieren especialmente contenidos en humedad residual inferiores al 5%.

- 40 El tamaño medio de partícula, medido por medio de difracción láser se encuentra en el intervalo de desde 10 micrómetros hasta 3 mm, se prefieren tamaños de partícula medios en el intervalo de desde 100 micrómetros hasta 1 mm. En particular debe limitarse el porcentaje de partículas con un tamaño inferior a 50 micrómetros, dado que esta fracción fina tiende a la formación de polvo no deseada durante la manipulación. Se prefieren especialmente materias sólidas con un porcentaje de partículas menores a 50 micrómetros inferior al 5% en masa.

- 45 El peso específico aparente de la preparación de hidrofobina seca se encuentra en el intervalo de desde 50 hasta 1200 kg/m<sup>3</sup>. Para procedimientos de secado por pulverización en torre de pulverización se prefieren pesos específicos aparentes de desde 80 hasta 400 kg/m<sup>3</sup>, de manera especialmente preferible de desde 100 hasta 300 kg/m<sup>3</sup>. En la granulación por pulverización en lecho fluidizado se prefieren pesos específicos aparentes de desde 500 hasta 1000 kg/m<sup>3</sup>, de manera especialmente preferible de desde 600 hasta 800 kg/m<sup>3</sup>.

La temperatura de la disolución que debe atomizarse debe ascender habitualmente a de 0 a 150°C. En el caso de las hidrofobinas, que se inactivan fácilmente por calor, se usan preferiblemente temperaturas de 0 - 80°C, en el caso de hidrofobinas estables al calor se usa preferiblemente una temperatura de desde 20 hasta 100°C.

- 50 Como agentes auxiliares de pulverización se tienen en cuenta alcoholes de azúcar. Alcoholes de azúcar especialmente adecuados son sorbitol, manitol e inositol. Por lo demás se tiene en cuenta celulosa, almidón y

## ES 2 374 320 T3

almidón de maíz como sustancia auxiliar de secado.

La cantidad en peso de agente auxiliar de pulverización asciende a del 5 al 200% en peso, preferiblemente del 20 al 200% en peso, y de manera especialmente preferible del 70 al 130% en peso, con respecto a la materia sólida de hidrofobina.

- 5 Mediante la introducción directa del agente auxiliar de pulverización en la zona de pulverización se evita en su mayor parte la sollicitación mecánica de las partículas, que parte por ejemplo de un lecho fluidizado cargado con vehículo.

Las preparaciones de hidrofobina pueden producirse también con mucho éxito sin usar agentes auxiliares de pulverización.

El nuevo procedimiento se describe en detalle en los siguientes ejemplos.

### 10 General

Denominaciones

Hidrofobina A:	YaaD-DewA-His6
Hidrofobina B:	YaaD-DewA-His6 de 40 aa
Contenido en sustancia seca:	TS [% en peso]

Prueba de actividad

- 15 Para evaluar la actividad proteica se recurre a las propiedades de recubrimiento de la proteína de fusión de hidrofobina granulada por pulverización o secada por pulverización disuelta de nuevo. La evaluación de las propiedades de recubrimiento se realiza preferiblemente sobre vidrio o teflón como modelos para superficies hidrófilas o hidrófobas.

Ensayos convencionales para recubrimiento

Vidrio:

- Concentración de hidrofobina: 50 mg/l
- 20 - Incubación de plaquitas de vidrio durante la noche (temperatura: 80°C) en Tris 10 mM a pH 8
- Tras el recubrimiento lavar en agua DI
- Después incubación 10 min. / 80°C / SDS al 1%
- Lavar en agua DI

Teflón:

- 25 - Concentración: 50 mg/l
- Incubación de plaquitas de teflón durante la noche (temperatura: 80°C) en Tris 10 mM a pH 8
- Tras el recubrimiento lavar en agua DI
- Incubación 10 min. / 80°C / Tween 20 al 0,1%
- Lavar en agua DI
- 30 - Después incubación 10 min. / 80°C / SDS al 1%
- Lavar en agua DI

Las muestras se secan al aire y se determina el ángulo de contacto (en grados) de una gota de 5 µl de agua. Se obtienen por ejemplo los siguientes valores:

Mezcla básica con proteína de fusión -YaaD-DewA (Control: sin proteína; pareja de fusión purificada --:YaaD-DewA-His<sub>6</sub> 100 mg/l):

	tras SDS al 1% a 80°C	
	teflón	vidrio
Control	96,8	30
YaaD	97,4	38,7
50 mg/l	85,9	77,9

5

### Fermentación y regeneración

Se inoculan 200 ml de medio de complejación en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml con dos deflectores laterales con una cepa de *E. coli* que expresa YaaD-DewA-His6 o YaaD-DewA-His6 de 40 aa de la placa de LB-Amp (ampicilina 100 µg/ml) (=primer cultivo previo). Se incuba la cepa hasta una DO<sub>600 nm</sub> de aproximadamente 3,5 a 37°C en un agitador con d<sub>0</sub>= 2,5 cm a 200 rpm. A continuación se inoculan 4 matraces Erlenmeyer de 1000 ml adicionales con deflectores (en cada caso con 200 ml de medio de complejación) con en cada caso 1 ml del primer cultivo previo y se incuban a 37°C en un incubador con agitación (d<sub>0</sub>= 2,5 cm, n = 200 rpm) (= 2º cultivo previo). En cuanto la DO<sub>600 nm</sub> es > 6, se inocula el prefermentador cargado con medio de complejación con este segundo cultivo agitado. Tras alcanzar una DO<sub>600 nm</sub> > 9 o TTO = 80 mmol/(l·h), se inocula el fermentador principal. Se hace pasar el cultivo principal en un procedimiento semicontinuo en un medio mineral con cantidades muy reducidas de componentes complejos. A una DO<sub>600 nm</sub> > 70 se inducen las células con 50 µm de IPTG. Tras un tiempo de inducción de entre 4 y 20 h se interrumpe la fermentación y se enfría el contenido del recipiente hasta 4°C. Se separan las células a continuación de la fermentación por ejemplo por medio de un separador en forma de disco (por ejemplo separador de boquillas) o medio microfiltración del caldo de fermentación y se resuspenden en agua DI. Tras una nueva separación mediante la utilización de un separador en forma de disco o de una microfiltración se disgregaron las células nuevamente resuspendidas mediante la utilización de un homogeneizador de alta presión a una presión diferencial de 2000 bar. Se separa el homogeneizado por medio de un separador en forma de disco (por ejemplo separador de boquillas) y se lava varias veces. Se ajusta el concentrado obtenido a pH 12,5. Tras aproximadamente 15 min. se baja el pH a 9. Se hace pasar la disolución que contiene hidrofobina neutralizada por una centrifuga tubular. Según el análisis de SDS-PAGE la hidrofobina está contenida en el sobrenadante tras la centrifugación final. Este sobrenadante se denomina en lo sucesivo "disolución acuosa de hidrofobina". El contenido en sustancia seca de la disolución acuosa de hidrofobina asciende habitualmente al 2-4% en peso. La concentración de hidrofobina determinada por medio de ELISA se encuentra en esta fase normalmente en el intervalo de 4-35 g/l.

### Ejemplo 1

En 866 kg de disolución acuosa de hidrofobina A con un contenido en sólidos del 3,4% en peso se introducen con agitación 28,6 kg de manitol. Se pulveriza la disolución con una boquilla de dos sustancias tipo Gerig Gr.O con una velocidad de pulverización de 41 kg/h en 1200 kg/h de nitrógeno en corriente paralela. La torre de pulverización tiene un diámetro de 800 mm y una altura de 12 m. La temperatura de entrada del gas de secado asciende a este respecto a 161°. La temperatura de salida del gas de secado asciende a 80°. La separación tiene lugar en el filtro, en el que se recuperan 31,7 kg de material a secar. De la torre se recogen 6,1 kg de material a secar. Los ángulos de contacto que resultan de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo se exponen en la tabla 1. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 1.

### Ejemplo 2

En 109 kg de disolución acuosa de hidrofobina B con un contenido en sólidos del 2,4% en peso y una concentración de hidrofobina de 4,5 g/l se introducen con agitación 2,4 kg de manitol. Se pulveriza la disolución con una boquilla de dos sustancias Niro de 3 mm con una velocidad de pulverización de 12,8 kg/h en 450 kg/h de nitrógeno en corriente paralela. La torre de pulverización (fabricada por la empresa Niro) tiene un diámetro de 1200 mm y una altura cilíndrica de 2650 mm. La altura de la parte cónica asciende a 600 mm. La temperatura de entrada del gas de secado asciende a 163°. La temperatura de salida del gas de secado asciende a 79°. En la descarga del ciclón se recuperan 4,1 kg de material a secar. En la descarga del filtro dispuesta aguas abajo se recuperan 0,73 kg de

material a secar. Los ángulos de contacto resultantes de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo se exponen en la tabla 2. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 2.

### Ejemplo 3

5 En 155 kg de disolución acuosa de hidrofobina A con un contenido en sólidos del 3,4% en peso y un contenido en hidrofobina de 31 g/l se introducen con agitación 5,4 kg de sulfato de sodio. Se pulveriza la disolución con una  
 10 velocidad de pulverización de 12,2 kg/h a través de una boquilla de dos sustancias Niro de 3 mm en 450 kg/h de nitrógeno en corriente paralela. La torre de pulverización (fabricada por la empresa NIRO) tiene un diámetro de 1200 mm y una altura cilíndrica de 2650 mm. La altura de la parte cónica asciende a 600 mm. La temperatura de entrada del gas de secado asciende a este respecto a 165°. La temperatura de salida del gas de secado asciende a 84°. En la descarga del ciclón se recuperan 5,5 kg de material a secar.

### Ejemplo 4

15 En 2 l de disolución acuosa de hidrofobina B con un contenido en sustancia seca de 20 g/l se introducen con agitación 40 g de sulfato de sodio. Se seca la disolución en un secador por pulverización de laboratorio Büchi con nitrógeno como gas de secado. La temperatura de entrada de gas asciende a 160°. La temperatura de salida de gas asciende a 80°C. En la descarga del ciclón se recuperan 40 g. Los ángulos de contacto resultantes del material a secar disuelto de nuevo se exponen en la tabla 3.

### Ejemplo 5

20 En 2 l de disolución acuosa de hidrofobina B con un contenido en sustancia seca de 20 g/l se introducen con agitación 40 g de maltodextrina. Se seca la disolución en un secador por pulverización de laboratorio Büchi con nitrógeno como gas de secado. La temperatura de entrada de gas asciende a 160°. La temperatura de salida de gas asciende a 80°C. En la descarga del ciclón se recuperan 39 g. Los ángulos de contacto resultantes del material a secar disuelto de nuevo se exponen en la tabla 4.

### Ejemplo 6

25 Se concentran 240 kg de disolución acuosa de hidrofobina A (TS = 3,4% en peso, concentración de hidrofobina 31 g/l). Se obtienen como resultado 65 kg de disolución acuosa de hidrofobina A con un contenido en sólidos del 13% en peso y un contenido en hidrofobina von 117 g/l. Esta disolución concentrada se pulveriza con una velocidad de pulverización de 13,7 kg/h a través de una boquilla de dos sustancias Niro de 3 mm en 450 kg/h de nitrógeno. La  
 30 torre de pulverización (fabricada por la empresa NIRO) tiene un diámetro de 1200 mm y una altura cilíndrica de 2650 mm. La altura de la parte cónica asciende a 600 mm. La temperatura de entrada del gas de secado asciende a este respecto a 165°. La temperatura de salida del gas de secado asciende a 84°. En la descarga del ciclón se recuperan 6,1 kg de material a secar. Los ángulos de contacto resultantes de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo se exponen en la tabla 5. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 3.

### Ejemplo 7

35 Se concentran 894 kg de disolución acuosa de hidrofobina B (TS = 2,4% en peso, concentración de hidrofobina 6,3 g/l). Se obtienen como resultado 226 kg de disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (TS = 9,7% en peso, concentración de hidrofobina 35,4 g/l). Se pulverizan 75 kg de esta disolución acuosa de hidrofobina B concentrada con un contenido en sólidos del 9,6% (contenido en hidrofobina de aproximadamente 35,4 g/l) a una temperatura de  
 40 25° con una boquilla de una sustancia (Niro) con un diámetro de 2 mm con una velocidad de pulverización de 13,6 kg/h en 450 kg/h de nitrógeno en corriente paralela. La torre de pulverización (fabricada por la empresa NIRO) tiene un diámetro de 1200 mm y una altura cilíndrica de 2650 mm. La altura de la parte cónica asciende a 600 mm. La temperatura de entrada del gas de secado asciende a este respecto a 168°. La temperatura de salida del gas de secado asciende a 84°. En el ciclón se recuperaron 5 kg y en el filtro 1,2 kg de producto. El material secado por  
 45 pulverización tiene una densidad aparente de 100 kg/m<sup>3</sup>. La pureza del material resultante, que se define como fracción porcentual de la concentración de hidrofobina con respecto a la proteína total, asciende al 45%. Los ángulos de contacto resultantes de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo se exponen en la tabla 6. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 4.

### Ejemplo 8

50 Se concentran 921 kg de disolución acuosa de hidrofobina A (TS = 2,3% en peso, concentración de hidrofobina de 18 g/l). Se obtienen como resultado 241 kg de disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (TS = 9,6% en peso, concentración de hidrofobina 98,3 g/l). Se alimenta esta disolución acuosa de hidrofobina A concentrada a un lecho

## ES 2 374 320 T3

fluidizado de pulverización ( $d = 150 \text{ mm}$ ,  $A = 0,177 \text{ m}^2$ ) en presencia de hidrofobina A seca. La pulverización de la disolución acuosa de hidrofobina A concentrada tiene lugar a través de una boquilla de 2 sustancias con un diámetro de 2 mm.

5 Parte 1: Se toman 2 kg de hidrofobina A del ejemplo 4. Se aumenta la velocidad de pulverización de la disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 1) por etapas a 1,8 kg/h; 2,5 kg/h; 3,3 kg/h. La temperatura de entrada de gas a una velocidad de pulverización de producto de 3,3 kg/h asciende a  $138^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $75 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $69^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 5,9 kg de la alimentación 1 resultan 0,44 kg de material a secar (muestra 1, figura 5).

15 Parte 2: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 1 (1,5 kg, tamaño de grano del original  $< 1,25 \text{ mm}$ ) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 2) con una velocidad de pulverización de 3,2 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $126^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $102 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $67^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 21,3 kg de la alimentación 2 resultan 1,6 kg de material a secar (muestra 2, figura 5).

20 Parte 3: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 2 (1,3 kg) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 3) con una velocidad de pulverización de 3,6 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $143^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $102 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $67^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 21,6 kg de la alimentación 3 resultan 1,6 kg de material a secar (muestra 3, figura 5).

30 Parte 4: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 3 (1,9 kg, tamaño de grano del original  $< 1,6 \text{ mm}$ ) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 4) con una velocidad de pulverización de 4,1 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $147^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $100 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $66^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 24,6 kg de la alimentación 4 resultan 1,9 kg de material a secar (muestra 4, figura 5).

35 Parte 5: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 4 (1,3 kg, tamaño de grano del original  $< 1,4 \text{ mm}$ ) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 5) con una velocidad de pulverización de 4 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $146^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $99 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $67^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 23 kg de la alimentación 5 resultan 1,7 kg de material a secar (muestra 5, figura 5).

45 Parte 6: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 5 (1,1 kg, tamaño de grano del original  $< 1,25 \text{ mm}$ ) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 6) con una velocidad de pulverización de 3,5 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $142^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $101 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $71^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 26,8 kg de la alimentación 6 resultan 2 kg de material a secar (muestra 6, figura 5). El peso específico aparente de la fracción útil asciende a 0,65 kg/l.

55 Parte 7: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 6 (1,2 kg, tamaño de grano del original  $< 1,25 \text{ mm}$ ) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina A concentrada (= alimentación 7) con una velocidad de pulverización de 3,7 kg/h. La temperatura media de entrada de gas asciende a  $141^\circ$  y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a  $99 \text{ m}^3/\text{h}$ . La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a  $72^\circ$ . El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 22,7 kg de la alimentación 7 resultan 1,7 kg de material a secar (muestra 7, figura 5). El peso específico aparente de la fracción útil asciende a 0,65 kg/l. La fracción con tamaño de grano de

entre 0,2-0,72 mm asciende a 98,9%.

Para la molienda del material grueso en este ejemplo es adecuado además del uso de una cortadora de grano, un molino de rodillos o una trituradora, o similar.

5 Los ángulos de contacto resultantes de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo se exponen en la tabla 7. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 5.

### Ejemplo 9

10 Se concentran 894 kg de disolución acuosa de hidrofobina B (TS = 2,4% en peso, concentración de hidrofobina 6,3 g/l). Se obtienen como resultado 226 kg de disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (TS = 9,7% en peso, concentración de hidrofobina 35,4 g/l).

15 Parte 1: Se toma 1 kg del material a secar que contiene hidrofobina B de un secado por pulverización de manera análoga al ejemplo 5. La temperatura de entrada de gas asciende a 141° y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a 49 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 69°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 5 kg de la alimentación 1 resultan 0,46 kg de material a secar.

20 Parte 2: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 1 (0,87 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 2) con una velocidad de pulverización de 3,8 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 139° y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a 99 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 67°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 22,8 kg de la alimentación 2 resultan 2,1 kg de material a secar. La fracción < 0,4 mm asciende a aproximadamente el 80%.

25 Parte 3: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 2 (0,87 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 3) con una velocidad de pulverización de 3,8 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 140° y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a 102 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 69°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 30,1 kg de la alimentación 3 resultan 2,78 kg de material a secar. La fracción entre 0,4-0,8 mm asciende al 80%.

35 Parte 4: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 3 (1,1 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 4) con una velocidad de pulverización de 3,5 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 142° y el correspondiente flujo de gas de secado (aire) a 96 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 72°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 25,9 kg de la alimentación 4 resultan 2,4 kg de material a secar. La fracción de 0,4-0,8 mm comprende aproximadamente el 80%.

40 Parte 5: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 4 (1,1 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 5) con una velocidad de pulverización de 3,4 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 139° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 99 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 72°. De 26,6 kg de la alimentación 5 resultan 2,5 kg de material a secar. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. La fracción de 0,2-0,8 mm comprende aproximadamente el 98%.

50 Parte 6: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 5 (1,1 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 6) con una velocidad de pulverización de 3,4 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 142° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 98 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 72°. De 25,4 kg de la alimentación 6 resultan 2,4 kg de material a secar. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla

tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. La fracción de 0,2-0,8 mm comprende el 91-95%. El peso específico aparente de la muestra asciende a 0,57 kg/l.

5 Parte 7: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 6 (1,4 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 7) con una velocidad de pulverización de 3,4 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 140° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 100 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 72°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 18,4 kg de la alimentación 7 resultan 1,8 kg de material a secar. La fracción de 0,2-0,4 mm es > 0,64 kg/l.

15 Parte 8: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 7 (1,2 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 8) con una velocidad de pulverización de entre 3 y 2,5 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 120° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 100 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 67°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 21,5 kg de la alimentación 8 resultan 2,1 kg de material a secar (figura 6). El porcentaje de la fracción entre 0,2-0,4 mm es >70,5%.

20 Parte 9: Sobre el material a secar que queda en el lecho fluidizado de la parte 8 (1,2 kg, tamaño de grano < 0,8 mm) se pulveriza disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 3) con una velocidad de pulverización de 4,1-4,4 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 163° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 97 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 77°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 29,6 kg de la alimentación 9 resultan 2,8 kg de material a secar. El porcentaje de la fracción entre 0,2-0,4 mm asciende al 14,8%.

30 Parte 10: Se toman 1,3 kg del material grueso molido en la parte 9 junto con el material fino (tamaño de grano del original < 0,8 mm). Se varía la velocidad de pulverización de la disolución acuosa de hidrofobina B concentrada (= alimentación 10) entre 4,9 y 5,1 kg/h. La temperatura de entrada de gas asciende a 181° y el correspondiente flujo de gas de secado (nitrógeno) a 95 m<sup>3</sup>/h. La temperatura media de salida de producto en la zona inferior del lecho fluidizado de pulverización asciende a 82°. El producto granulado se descarga de manera continua a través de un husillo de descarga. El tamaño de grano se controla tamizando la descarga y moliendo correspondientemente el material grueso en una cortadora de grano. De 43,1 kg de la alimentación 10 resultan 4,1 kg de material a secar (muestra 10, figura 6). El porcentaje de la fracción entre 0,2-0,4 mm asciende al 12,6%.

35 Los ángulos de contacto resultantes de la prueba de actividad del material a secar que contiene hidrofobina disuelto de nuevo de la muestra final (parte 10) se exponen en la tabla 8. El gel de proteína del material a secar disuelto de nuevo se representa en la figura 6.

Tabla 1: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina A con manitol.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	20,5	108,2
<b>Ejemplo 1</b>	66,2	85,5

40 Tabla 2: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina B con manitol.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	21,1	108,6
<b>Ejemplo 2</b>	68,3	78,2

Tabla 3: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina A con sulfato de sodio.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	15	110,8
<b>Ejemplo 4</b>	64,9	86,3

Tabla 4: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina A con maltodextrina.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	15	110,8
<b>Ejemplo 5</b>	65,7	85,7

5 Tabla 5: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina A sin sustancia auxiliar.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	15,5	107
<b>Ejemplo 6</b>	65,9	85,6

Tabla 6: Ángulo de contacto tras el secado por pulverización de hidrofobina B sin sustancia auxiliar.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	32,8	96,2
<b>Ejemplo 7</b>	69,6	74,8

Tabla 7: Ángulo de contacto tras la granulación por pulverización de hidrofobina A sin sustancia auxiliar.

<b>Ejemplo 8</b>	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	13	97,8
<b>Parte 1</b>	60,7	75,9
<b>Parte 2</b>	62,2	81,2
<b>Parte 3</b>	60,5	81,9
<b>Parte 4</b>	60,9	62,5
<b>Parte 5</b>	58,9	70,1
<b>Parte 6</b>	60	72,5
<b>Parte 7</b>	59,3	72,9

Tabla 8: Ángulo de contacto tras la granulación por pulverización de hidrofobina B sin sustancia auxiliar.

	Vidrio	Teflón
<b>Control</b>	23,3	100,8
<b>Ejemplo 9, muestra final, parte 10</b>	72,1	69,7

Explicación de las figuras:

Figura 1: gel de proteína del ejemplo 1:

- 5 Tampón de gel Bis-Tris al 4-12%/MES, a la izquierda: tras el secado por pulverización de hidrofobina A con manitol, a la derecha: marcador: Prestained SDS-Page Standards, aplicación/ranura: 15 µg de Pr, figura 2: gel de proteína ejemplo 2.

Figura 3: gel de proteína del ejemplo 6:

- 10 Tampón de gel Bis-Tris al 4-12%/MES, a la izquierda: marcador: Prestained SDS-Page Standards, aplicación/ranura: 15 µg de Pr, a la derecha: tras el secado por pulverización de hidrofobina A sin sustancia auxiliar.

Figura 4: gel de proteína del ejemplo 7:

Tampón de gel Bis-Tris al 4-12%/MES, a la izquierda: marcador: Prestained SDS-Page Standards, aplicación/ranura: 15 µg de Pr, en el centro/a la derecha: tras el secado por pulverización de hidrofobina B sin sustancia auxiliar.

Figura 5: gel de proteína del ejemplo 8:

- 15 Tampón de gel Bis-Tris al 4-12%/MES, a la izquierda: marcador: Prestained SDS-Page Standards, aplicación/ranura: 15 µg de Pr, resto: Partes 1-7 tras la granulación por pulverización de hidrofobina A sin sustancia auxiliar.

Figura 6: gel de proteína del ejemplo 9:

Tampón de gel Bis-Tris al 4-12%/MES, a la izquierda: marcador: Prestained SDS-Page Standards, aplicación/ranura: 15 µg de Pr, a la derecha: muestra 10 tras la granulación por pulverización de hidrofobina B sin sustancia auxiliar.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la producción de preparaciones de hidrofobina secas, de flujo libre, estables, mediante pulverización y secado de disoluciones acuosas de hidrofobina que contienen dado el caso aditivos en un dispositivo de pulverización, caracterizado porque la pulverización tiene lugar a una temperatura de aire de entrada de entre 120 y 200°C y/o porque la pulverización tiene lugar a una temperatura de aire de salida de entre 50 y 120°C.  
5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se pulveriza la disolución de hidrofobina usando conjuntamente desde el 5 hasta el 200% en peso, con respecto al contenido en sólidos de hidrofobina de la disolución, de un agente auxiliar de pulverización orgánico o inorgánico, y se secan las partículas así obtenidas, cargadas con agente auxiliar de pulverización.  
10
3. Procedimiento según la reivindicación 1, para la producción de preparaciones de hidrofobina en forma de productos granulados, caracterizado porque además del dispositivo de pulverización se usa también un lecho fluidizado.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como agente auxiliar de pulverización se usan uno o varios alcoholes de azúcar, celulosas o almidones.  
15
5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como agente auxiliar de pulverización se usa manitol.

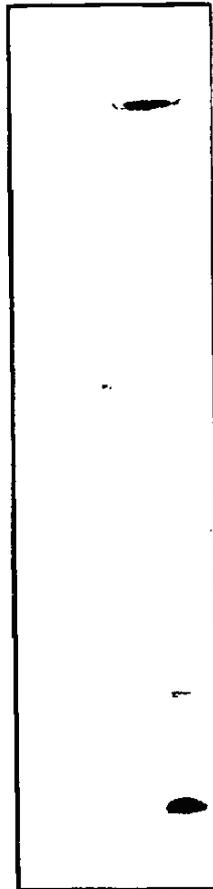


Fig. 1:

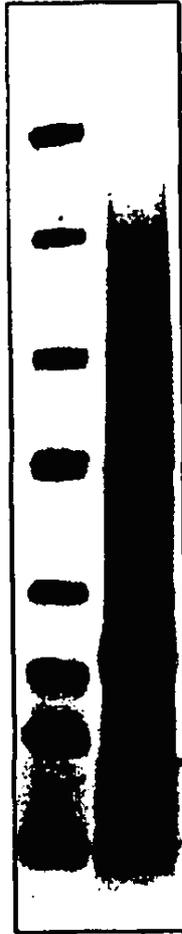


Fig. 2:

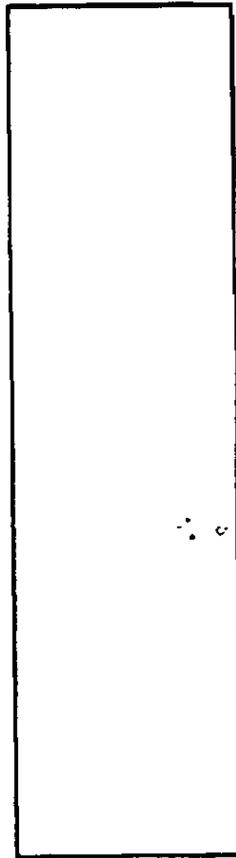


Fig. 3:

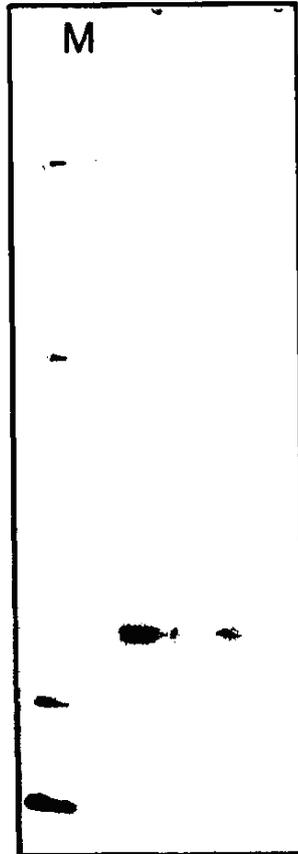


Fig. 4:

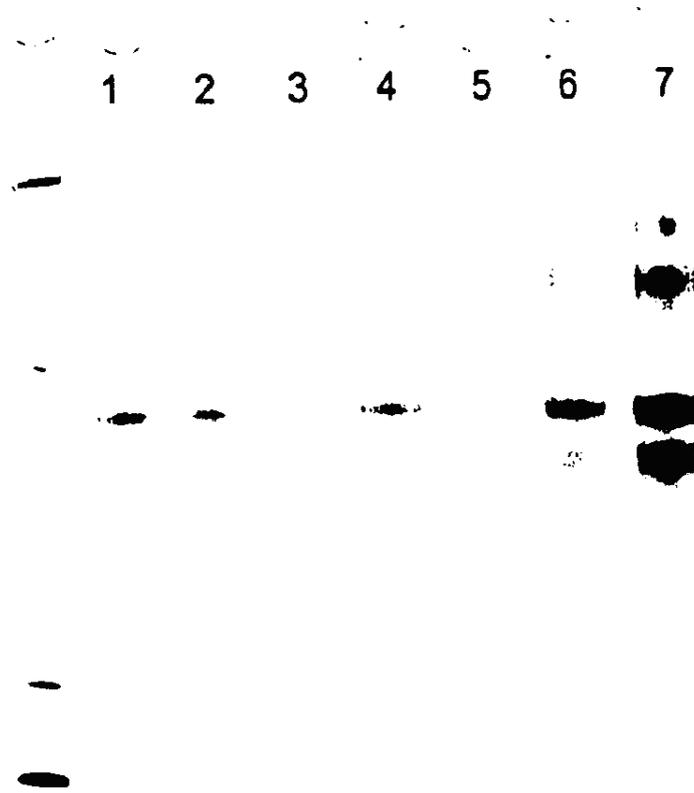


Fig. 5:

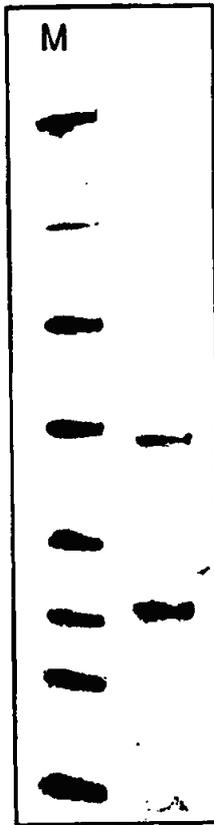


Fig. 6: