

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Februar 2008 (21.02.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2008/019965 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:  
**F26B 3/08** (2006.01) **B01J 8/24** (2006.01)

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT**; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/058103

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. August 2007 (06.08.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
06118947.8 15. August 2006 (15.08.2006) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BASF AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHÖNHERR, Michael** [DE/DE]; Conrad-Linck-Str.18, 67227 Frankenthal (DE). **FAUST, Tillmann** [DE/DE]; Parkweg 4, 67256 Weisenheim (DE). **RICHTER, Ulrike** [DE/DE]; Carl-Bosch-Str. 38, 67056 Ludwigshafen (DE). **SUB-KOWSKI, Thomas** [DE/DE]; Wichernstr. 13, 68526 Ladenburg (DE). **KAROS, Marvin** [DE/DE]; Fröbelstr. 2, 67433 Neustadt (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF DRY FREE-FLOWING HYDROPHOBIN PREPARATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TROCKENEN FREIFLIESSENDEN HYDROPHOBINZUBE-  
REITUNGEN

(57) Abstract: Method for the production of dry, free-flowing, stable hydrophobin preparations by spraying and drying of aqueous hydrophobin solutions in a spray device, optionally containing additives.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von trockenen, freifliessenden, stabilen Hydrophobinzubereitungen durch Versprühen und Trocknen von gegebenenfalls Zusatzstoffe enthaltenden wässrigen Hydrophobinlösungen in einer Sprüheinrichtung.



WO 2008/019965 A1

## Verfahren zur Herstellung von trockenen freifliessenden Hydrophobinzubereitungen

## Beschreibung der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von trockenen, freifliessenden, stabilen Hydrophobinzubereitungen durch Versprühen einer wässrigen Hydrophobinlösung in einer Sprüheinrichtung. Weiterhin betrifft sie nach diesem Verfahren hergestellte Hydrophobinzubereitungen, die diese Hydrophobinzubereitungen

10

enthalten. Die Isolierung von Hydrophobinen geschieht üblicherweise als wässrige Lösung. In dieser Form verlieren die Hydrophobine ihre Aktivität oder werden mikrobiell zersetzt und lassen sich nur unter grossem Aufwand lagern und transportieren. Deshalb ist es wünschenswert, trockene Zubereitungen von Hydrophobinen herzustellen, die das

15

Hydrophobin unter möglichst geringem Verlust seiner spezifischen Wirkung in konzentrierter Form enthalten. Ausserdem sollen diese Zubereitungen aus Teilchen mit gut ausgebildeter Oberfläche in einer Korngrösse von 50 bis 600 µm bestehen, so dass in der weiterverarbeitenden Industrie eine homogene Mischung dieser Produkte mit anderen Stoffen oder eine gute Applizierbarkeit gewährleistet ist.

20

Es gibt verschiedene Sprühverfahren, um Wasser aus Enzym-haltigen wässrigen Medien zu entfernen.

25

In der amerikanischen Patentschrift 4,617,272 werden Enzym-haltige Medien auf in einem Fliessbett erhitzte Inertpartikel aufgesprüht.

Als geeignete Inertpartikel werden Polyolefine, Polycarbonate, Polymethylmethacrylate oder Polystyrol genannt.

30

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die mittels dieser Inertpartikel hergestellten Enzym-Trockenpulver nicht in der Nahrungs- und Futtermittelindustrie eingesetzt werden können.

35

Nach einem anderen Verfahren, das in dem Wirtschaftspatent DD 263 790 beschrieben ist, werden Milchgerinnungsproteasenprodukte hergestellt, indem man wässrige Proteaselösungen auf Trägerstoffe, die sich in einem Wirbelschichtgranulator befinden, aufsprüht. Als Trägerstoffe werden Magermilchpulver und/oder dextrinhaltige Stoffe

beschrieben.

Obwohl die erhaltenen Produkte gute Enzym-Stabilität und Rieselfähigkeit besitzen und die verwendeten Trägerstoffe physiologisch verträglich sind, hat dieses Verfahren  
5 den Nachteil, dass die bis zu 10fache Menge an Trägerstoffen, bezogen auf Enzym-Feststoff, eingesetzt werden muss.

EP 522269 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von trockenen, freifliessenden, stabilen Enzymzubereitungen durch Versprühen von gegebenenfalls Zusatzstoffe ent-  
10 haltenden wässrigen Enzymlösungen in einer Sprüheinrichtung, dadurch gekennzeichnet, dass man die Enzymlösung unter Mitverwendung von 5 bis 60 Gew.-%, bezogen auf den Enzym-Feststoffgehalt der Lösung, eines Sprühhilfsmittels, bestehend aus hydrophober Kieselsäure und/oder einem Metallsalz einer höheren Fettsäure bei 0 bis  
15 50° C versprüht und die so erhaltenen, mit Sprühhilfsmittel beladenen Teilchen trocknet.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren vorzuschlagen, das es gestattet, wässrige Hydrophobinlösungen in trockene, stabile Hydrophobinzubereitungen zu überführen, die in der weiterverarbeitenden Industrie eingesetzt werden kön-  
20 nen.

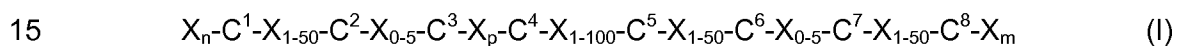
Es wurde nun gefunden, dass das eingangs definierte Verfahren zu besonders gut geeigneten Hydrophobinzubereitungen führt, wenn die gegebenenfalls Zusatzstoffe enthaltende wässrige Hydrophobinlösung unter Mitverwendung von 5 bis 200 Gew.-%, bezogen auf den Hydrophobin-Feststoffgehalt der Lösung, eines Sprühhilfsmittels, bestehend aus einem oder mehreren Zuckeralkoholen versprüht und die so erhaltenen, mit Sprühhilfsmittel beladenen Teilchen getrocknet werden.  
25

Hydrophobine sind kleine Proteine von etwa 100 AS, die charakteristisch für filamentöse Pilze sind und nicht in anderen Organismen vorkommen. Kürzlich wurden Hydrophobin-ähnliche Proteine in *Streptomyces coelicolor* entdeckt, die als „Chapline“ bezeichnet werden und ebenfalls hoch oberflächenaktive Eigenschaften haben. An Wasser/Luft-Grenzflächen können sich Chapline zu Amyloid-ähnlichen Fibrillen assemblieren (Classen et al. 2003 Genes Dev 1714-1726 ; Elliot et al. 2003, Genes Dev.  
30 17, 1727-1740).

Hydrophobine sind in einer wasserunlöslichen Form auf der Oberfläche von verschiedenen pilzlichen Strukturen, wie z.B. Lufthyphen, Sporen, Fruchtkörpern, verteilt. Die Gene für Hydrophobine konnten aus Ascomyzeten, Deuteromyzeten und Basidiomyceten isoliert werden. Einige Pilze enthalten mehr als ein Hydrophobingen, z.B. *Schizophyllum commune*, *Coprinus cinereus*, *Aspergillus nidulans*. Offensichtlich sind verschiedene Hydrophobine in unterschiedlichen Stadien der pilzlichen Entwicklung involviert. Die Hydrophobine sind dabei vermutlich verantwortlich für unterschiedliche Funktionen (van Wetter et al., 2000, Mol. Microbiol., 36, 201-210; Kershaw et al. 1998, Fungal Genet. Biol, 1998, 23, 18-33).

#### 10 Beschreibung der Erfindung

Besonders gut geeignete Hydrophobine für das erfindungsgemäße Verfahren sind Polypeptide der allgemeinen Strukturformel (I)



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann und die bei X stehenden Indizes die Anzahl der Aminosäuren darstellen, wobei die  
 20 Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 500 , bevorzugt zwischen 15 und 300, stehen, p für eine Zahl zwischen 1 und 250, bevorzugt 1-100 steht, und C für Cystein, Alanin, Serin, Glycin, Methionin oder Threonin steht, wobei mindestens vier der mit C benannten Reste für Cystein stehen, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  oder  $X_p$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 20 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht , die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist,  
 25 die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens 20° bewirken.

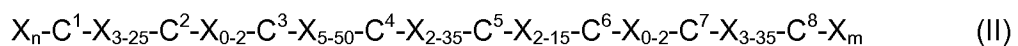
30 Die mit  $C^1$  bis  $C^8$  benannten Aminosäuren sind bevorzugt Cysteine; sie können aber auch durch andere Aminosäuren ähnlicher Raumerfüllung, bevorzugt durch Alanin, Serin, Threonin, Methionin oder Glycin ersetzt werden. Allerdings sollen mindestens vier, bevorzugt mindestens 5, besonders bevorzugt mindestens 6 und insbesondere mindestens 7 der Positionen  $C^1$  bis  $C^8$  aus Cysteinen bestehen. Cysteine können in  
 35 den erfindungsgemässen Proteinen entweder reduziert vorliegen oder miteinander Disulfidbrücken ausbilden. Besonders bevorzugt ist die intramolekulare Ausbildung von C-C Brücken, insbesondere die mit mindestens einer, bevorzugt 2, besonders bevor-

zugt 3 und ganz besonders bevorzugt 4 intramolekulare Disulfidbrücken. Bei dem oben beschriebenen Austausch von Cysteinen durch Aminosäuren ähnlicher Raumerfüllung werden vorteilhaft solche C-Positionen paarweise ausgetauscht, die intramolekulare Disulfidbrücken untereinander ausbilden können.

5

Falls in den mit X bezeichneten Positionen auch Cysteine, Serine, Alanine, Glycine, Methionine oder Threonine verwendet werden, kann sich die Nummerierung der einzelnen C-Positionen in den allgemeinen Formeln entsprechend verändern.

10 Besonders vorteilhafte Polypeptide sind solche der allgemeinen Formel (II)



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann und die bei X stehenden Indizes die Anzahl der Aminosäuren darstellen, wobei die Indizes n und m für Zahlen zwischen 2 und 300 stehen und C für Cystein, Alanin, Serin, Glycin, Methionin oder Threonin steht, wobei mindestens vier der mit C benannten Reste für Cystein stehen, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 35 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist, die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens 20° bewirken.

25 Die Herkunft der Hydrophobine spielt dabei keine Rolle. So können die Hydrophobine beispielsweise aus Mikroorganismen wie z.B. Bakterien, Hefen und Pilzen isoliert worden sein. Insbesondere Hydrophobine, die mittels gentechnisch veränderter Organismen gewonnen wurden, kommen erfindungsgemäß in Betracht.

30 Als Zusatzstoffe, die der wässrigen Hydrophobinlösung beigegeben werden können, kommen übliche, bevorzugt physiologisch unbedenkliche Materialien, in Betracht.

Hierzu zählen Polysaccharide wie Zelluloseverbindungen, Pektine und Stärken unterschiedlicher Herkunft, filmbildende Kolloide wie Gelatine, Casein oder Albumin, Mono- oder Disaccharide wie Glucose, Fructose, Lactose oder Saccharose, oder pflanzliche Produkte wie beispielsweise Weizengriesskleie oder Sojamehl.

35

Weiterhin können als Zusatzstoffe anorganische Materialien wie Calciumcarbonat, Tonerden, verschiedene Formen von gefällten oder mineralischen Kieselsäuren und Silikaten aber auch Produkte tierischer Herkunft, wie z.B. Eierschalenmehl, verwendet werden. Ausserdem können noch weitere Zusätze wie Emulgatoren, Antioxidantien  
5 oder Konservierungsmittel verwendet werden.

Die Menge der angewandten Zusatzstoffe beträgt in der Regel 5 bis 200 Gew.-%, bevorzugt 20 bis 200 Gew.-%, bezogen auf Hydrophobin-Feststoff.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren kann folgendermaßen ausgeführt werden:  
Das Sprühhilfsmittel wird zusammen mit Luft oder einem Inertgas durch Versprühen in eine Sprüheinrichtung, vorzugsweise einen Sprühturm, eingebracht. Die Zufuhr des Sprühhilfsmittels erfolgt zweckmässig oberhalb des Zerstäubungsaggregats. Als Sprühtürme kommen alle dem Fachmann bekannten Ausführungsformen in Frage  
15 (siehe z.B. K. Masters, Spray Drying Handbook, ISBN 0-582-06266-7)

Die wässrige Hydrophobinlösung kann unter Druck durch Düsen in den mit Sprühhilfsmittel beladenen Sprühraum eingebracht werden. Es ist aber auch möglich, die wässrige Hydrophobinlösung auf schnell rotierende Zerstäuberscheiben fließen zu lassen.

20 Die Ausbildung des Zerstäubungsaggregats hat keinen entscheidenden Einfluss auf das Produkt. Auch weitere dem Fachmann bekannte Zerstäubereinrichtungen können zum Einsatz gebracht werden (siehe z.B. Arthur H. Levebvre, Atomization and Sprays, ISBN 0-89116-603-3).

25 Der sich ausbildende Sprühkegel enthält eine Vielzahl kleiner Tröpfchen, die anschließend durch Wasserentzug in eine trockene Hydrophobinzubereitung überführt werden. Die Trocknung geschieht zweckmäßigerweise unmittelbar nach der Versprühung. Geeignet ist hierfür die Verdunstungstrocknung, bei der das Wasser aus den Tröpfchen mit Hilfe eines angewärmten Luft- oder Inertgasstroms entfernt wird.

30

Besonders bevorzugt kann zur Trocknung ein Wirbelbett verwendet werden, das sich unterhalb des Zerstäubungsaggregats oder im Bereich des Zerstäubungsaggregats befindet. Das Wirbelbett kann entweder als integraler Bestandteil eines Sprühturms betrieben werden (z.B. FSD-Technologie der Fa. Niro oder SBD-Technologie der Fa. Anhydro) oder es wird eine Trocknungstechnologie eingesetzt die dem Fachmann als Wirbelschicht-Sprühgranulation bekannt ist und z.B. von Hans Uhlemann und Lothar Mörl im Buch "Wirbelschicht-Sprühgranulation", ISBN 3-540-66985-x, erläutert wird.  
35

Bei besonders oxidationsempfindlichen Hydrophobinen wird die Verwendung von Inertgas, wie z.B. Stickstoff, bei der Versprühung und der Trocknung bevorzugt.

- 5 Die mit diesem Verfahren hergestellten Hydrophobinzubereitungen zeichnen sich durch ihre gute Stabilität und durch einen geringen Restfeuchtegehalt aus. Die Restfeuchte beträgt weniger als 10 %, bezogen auf Festsubstanz, gemessen nach Karl-Fischer-Titration, vorzugsweise ist sie kleiner 7%, besonders bevorzugt werden Restfeuchtegehalte kleiner 5%.

10

Die mittlere Partikelgröße, gemessen mittel Laserbeugung liegt im Bereich von 10 Mikrometer bis 3 mm, bevorzugt werden mittlere Partikelgrößen im Bereich von 100 Mikrometer bis 1 mm Insbesondere ist der Anteil an Partikeln mit einer Größe kleiner 50 Mikrometer zu beschränken, da diese Feinfraktion zur unerwünschten Staubbildung bei der Handhabung neigt. Besonders bevorzugt werden Feststoffe mit einem Anteil von Partikeln kleiner 50 Mikrometer von weniger als 5 Massen%.

15

Das Schüttgewicht der trockenen Hydrophobinzubereitung liegt im Bereich von 50 bis 1200 kg/m<sup>3</sup>. Für Sprühtrocknungsverfahren im Sprühturm werden Schüttgewichte von 80 bis 400 kg/m<sup>3</sup> bevorzugt, besonders bevorzugt von 100 bis 300 kg/m<sup>3</sup>. Bei der Wirbelschicht-Sprühgranulation werden Schüttgewichte von 500 bis 1000 kg/m<sup>3</sup> bevorzugt, besonders bevorzugt von 600 bis 800 kg/m<sup>3</sup>.

20

- 25 Die Temperatur der zu zerstäubenden Lösung soll üblicherweise 0 bis 150° C betragen. Bei Hydrophobinen, die leicht durch Wärme inaktiviert werden, werden bevorzugt Temperaturen von 0 – 80° C verwendet, bei Hitze-stabilen Hydrophobinen wird eine Temperatur von 20 bis 100° C bevorzugt verwendet.

- 30 Als Sprühhilfsmittel kommen Zuckeralkohole in Betracht. Besonders geeignete Zuckeralkohole sind Sorbit, Mannit und Inosit. Desweiteren kommt Zellulose, Stärke, und Maisstärkeals Trocknungshilfsstoff in Betracht.

- 35 Die Gewichtsmenge an Sprühhilfsmittel beträgt 5 bis 200 Gew.-%, bevorzugt 20 bis 200Gew.-%, und besonders bevorzugt 70 bis 130 Gew.-%, bezogen auf Hydrophobin-Feststoff.

Durch das direkte Einbringen des Sprühhilfsmittels in die Sprühzone wird die mechani-

sche Beanspruchung der Partikel weitgehend vermieden, die beispielsweise von einem Träger-gefüllten Fliessbett ausgeht.

Die erfindungsgemäßen Hydrophobinzubereitungen können auch ohne Verwendung  
5 von Sprühhilfsmitteln mit gutem Erfolg hergestellt werden.

Im einzelnen ist das neue Verfahren in den folgenden Beispielen beschrieben.

Allgemein

10

### Bezeichnungen

|                        |                      |
|------------------------|----------------------|
| Hydrophobin A:         | YaaD-DewA-His6       |
| Hydrophobin B:         | 40 AS YaaD-DewA-His6 |
| Trockensubstanzgehalt: | TS [gew- %]          |

15

Aktivitätstest

Zur Beurteilung der Proteinaktivität werden die Beschichtungseigenschaften des wieder-  
dergelösten sprühgetrockneten bzw. sprühgranulierten Hydrophobinfusionsproteins  
herangezogen. Die Evaluierung der Beschichtungseigenschaften wird bevorzugt auf  
20 Glas bzw. Teflon als Modelle für hydrophile bzw. hydrophobe Oberflächen vorgenom-  
men.

Standard-Versuche für Beschichtung

Glas:

- Konzentration Hydrophobin: 50 mg/L
- 25 - Inkubation von Glasplättchen über Nacht (Temperatur: 80°C) in 10mM Tris  
pH8
- nach Beschichtung waschen in VE-Wasser
- danach Inkubation 10min / 80°C / 1% SDS
- waschen in VE-Wasser

30

Teflon:

- Konzentration: 50 mg/L
- Inkubation von Teflonplättchen über Nacht (Temperatur: 80°C) in 10mM Tris  
pH 8
- 35 - nach Beschichtung waschen in VE-Wasser

- Inkubation 10min / 80°C / 0,1% Tween 20
- waschen in VE-Wasser
- danach Inkubation 10min / 80°C / 1% SDS
- waschen in VE-Wasser

5

Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bestimmt. Es ergeben sich z.B. folgende Werte:

Ansatz mit -YaaD-DewA Fusionsprotein (Kontrolle: ohne Protein; --:YaaD-DewA-His<sub>6</sub>

10 100 mg/L gereinigter Fusionspartner):

|           | nach 1%SDS 80°C |      |
|-----------|-----------------|------|
|           | Teflon          | Glas |
| Kontrolle | 96,8            | 30   |
| YaaD      | 97,4            | 38,7 |
| 50 mg/L   | 85,9            | 77,9 |

### Fermentation und Aufarbeitung

- 15 200ml Komplexmedium werden in einem 1000 mL Erlenmeyerkolben mit zwei Seitenschikanen werden mit einem YaaD-DewA-His6 oder 40 AS YaaD-DewA-His6 exprimierenden *E.coli* Stamm von LB-Amp Platte (100µg/ml Ampicillin) inokuliert (=erste Vorkultur). Der Stamm wird bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von ca 3,5 bei 37°C auf einem Schüttler mit d<sub>0</sub>= 2,5 cm bei 200 rpm inkubiert. Im Anschluss werden 4 weitere 1000 mL Erlenmeyer-
- 20 erkolben mit Schikanen (jeweils mit 200 mL Komplexmedium) mit jeweils 1 mL der ersten Vorkultur beimpft und bei 37°C im Schüttelschrank (d<sub>0</sub>= 2,5 cm, n = 200 rpm) inkubiert (= 2. Vorkultur). Sobald die OD<sub>600nm</sub> > 6 ist, wird der mit Komplexmedium gefüllte Vorfermenter aus dieser zweiten Schüttelkultur beimpft. Nach Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> > 9 oder OTR = 80 mmol/(l·h), wird der Hauptfermenter beimpft. Die Hauptkultur wird
- 25 im Fed-Batch Verfahren in mineralischem Medium mit sehr geringen Mengen komplexer Bestandteile gefahren. Bei einer OD<sub>600nm</sub> > 70 werden die Zellen mit 50 µm IPTG induziert. Nach einer Induktionszeit zwischen 4 und 20h wird die Fermentation abgebrochen und der Kesselinhalt auf 4 °C gekühlt. Die Zellen werden im Anschluss an die Fermentations z.B. mittels eines Tellerseparators (z.B. Düsenseparators) oder
- 30 durch Mikrofiltration von der Fermentationsbrühe abgetrennt und in VE-Wasser resuspendiert. Nach erneuter Separation durch Einsatz eines Tellerseparators oder einer

Mikrofiltration werden die erneut resuspendierten Zellen durch Einsatz eines Hochdruckhomogenisators bei einem Differenzdruck von 2000 bar aufgeschlossen. Das Homogenisat wird mittels eines Tellerseparators (z.B. Düsenseparator) abgetrennt und mehrfach gewaschen. Das erhaltene Konzentrat wird auf pH 12,5 eingestellt. Nach  
5 ca. 15 min. wird der pH auf 9 abgesenkt. Die neutralisierte Hydrophobin-haltige Lösung wird zur Feststoffabtrennung über eine Röhrenzentrifuge gefahren. Gemäß SDS-PAGE Analyse ist das Hydrophobin nach der abschliessenden Zentrifugation im Überstand enthalten. Dieser Überstand wird im folgenden als „wässrige Hydrophobin-Lösung bezeichnet“. Der Trockensubstanzgehalt der wässrigen Hydrophobin-Lösung  
10 beträgt üblicherweise 2-4 gew-%. Die mittels ELISA bestimmte Hydrophobinkonzentration liegt auf dieser Stufe typischerweise im Bereich 4-35 g/L.

### Beispiel 1

In 866 kg wässrige Hydrophobin A-Lösung mit einem Feststoffgehalt von 3,4 gew- %  
15 werden 28,6 kg Mannit eingerührt. Die Lösung wird mit einer Zweistoffdüse Typ Gerig Gr.0 mit einer Einsprührate von 41 kg/h in 1200 kg/h Stickstoff im Gleichstrom versprüht. Der Sprühturm hat einen Durchmesser von 800 mm und eine Höhe von 12 m. Die Eintrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt dabei 161 DEG. Die Austrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 80 DEG. Die Abscheidung erfolgt im Filter,  
20 in welchem 31,7 kg Trockengut wiedergefunden werden. Aus dem Turm werden 6,1 kg Trockengut ausgekehrt. Die aus dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts sind in Tab. 1 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb.1 dargestellt.

### 25 Beispiel 2

In 109 kg wässrige Hydrophobin B-Lösung mit einem Feststoffgehalt von 2,4 gew- % und einer Hydrophobinkonzentration von 4,5 g/L werden 2,4 kg Mannit eingerührt. Die Lösung wird mit einer 3mm Niro-Zweistoffdüse mit einer Einsprührate von 12,8 kg/h in 450 kg/h Stickstoff im Gleichstrom versprüht. Der Sprühturm (Hersteller Fa. Niro) hat  
30 einen Durchmesser von 1200 mm und eine zylindrische Höhe von 2650 mm. Die Höhe des konischen Teils beträgt 600 mm. Die Eintrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 163 DEG. Die Austrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 79 DEG. Im Zyklonaustrag werden 4,1 kg Trockengut wiedergefunden. Im nachgeschalteten Filteraustrag werden 0,73 kg Trockengut wiedergefunden. Die aus dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts sind in  
35 Tab. 2 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb.2 dargestellt.

**Beispiel 3**

In 155 kg wässrige Hydrophobin A-Lösung mit einem Feststoffgehalt von 3,4 gew- % und einem Hydrophobingehalt von 31 g/L werden 5,4 kg Natriumsulfat eingerührt. Die Lösung wird mit einer Einsprührate von 12,2 kg/h über eine 3 mm Niro Zweistoffdüse in 450 kg/h Stickstoff im Gleichstrom versprüht. Der Sprühturm (Hersteller Fa. NIRO) hat einen Durchmesser von 1200 mm und eine zylindrische Höhe von 2650 mm. Die Höhe des konischen Teils beträgt 600 mm. Die Eintrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt dabei 165 DEG. Die Austrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 84 DEG. Im Zyklonaustrag werden 5,5 kg Trockengut wiedergefunden.

**Beispiel 4**

In 2 L wässrige Hydrophobin B-Lösung mit einem Trockensubstanzgehalt von 20 g/L werden 40 g Natriumsulfat eingerührt. Die Lösung wird in einem Büchi Laborsprüh-trockner mit Stickstoff als Trocknungsgas getrocknet. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 160 DEG. Die Gasaustrittstemperatur beträgt 80 °C. Im Zyklonaustrag werden 40 g wiedergefunden. Die resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Trockenguts sind in Tab. 3 aufgeführt.

**Beispiel 5**

In 2 L wässrige Hydrophobin B-Lösung mit einem Trockensubstanzgehalt von 20 g/L werden 40 g Maltodextrin eingerührt. Die Lösung wird in einem Büchi Laborsprüh-trockner mit Stickstoff als Trocknungsgas getrocknet. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 160 DEG. Die Gasaustrittstemperatur beträgt 80 °C. Im Zyklonaustrag werden 39 g wiedergefunden. Die resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Trockenguts sind in Tab. 4 aufgeführt.

**Beispiel 6**

240 kg wässrige Hydrophobin A-Lösung (TS = 3,4 gew-%, Hydrophobinkonzentration 31 g/L) werden aufkonzentriert. Es resultieren 65 kg wässrige Hydrophobin A-Lösung mit einem Feststoffgehalt von 13 gew- % und einem Hydrophobingehalt von 117 g/L. Diese aufkonzentrierte Lösung wird mit einer Einsprührate von 13,7 kg/h über eine 3 mm Niro Zweistoffdüse in 450 kg/h Stickstoff versprüht. Der Sprühturm (Hersteller Fa. NIRO) hat einen Durchmesser von 1200 mm und eine zylindrische Höhe von 2650 mm. Die Höhe des konischen Teils beträgt 600 mm. Die Eintrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt dabei 165 DEG. Die Austrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 84 DEG. Im Zyklonaustrag werden 6,1 kg Trockengut wiedergefunden. Die aus

dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts sind in Tab. 5 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb. 3 dargestellt.

#### 5 Beispiel 7

894 kg wässrige Hydrophobin B-Lösung (TS = 2,4 gew-%, Hydrophobinkonzentration 6,3 g/L) werden aufkonzentriert. Es resultieren 226 kg aufkonzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (TS = 9,7 gew-%, Hydrophobinkonzentration 35,4 g/L). 75 kg dieser aufkonzentrierten wässrigen Hydrophobin B-Lösung mit einem Feststoffgehalt von 9,6 % (Hydrophobingehalt ca. 35,4 g/L) wird mit einer Temperatur von 25 DEG mit einer Einstoffdüse (Niro) mit einem Durchmesser von 2 mm mit einer Einsprührate von 13,6 kg/h in 450 kg/h Stickstoff im Gleichstrom versprüht. Der Sprühturm (Hersteller Fa. NIRO) hat einen Durchmesser von 1200 mm und eine zylindrische Höhe von 2650 mm. Die Höhe des konischen Teils beträgt 600 mm. Die Eintrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt dabei 168 DEG. Die Austrittstemperatur des Trocknungsgases beträgt 84 DEG. Im Zyklon wurden 5 kg und im Filter 1,2 kg Produkt wiedergefunden. Das sprühgetrocknete Material hat eine Schüttdichte von 100 kg/m<sup>3</sup>. Die Reinheit des resultierenden Materials, die als prozentualer Anteil von Hydrophobin- zu Gesamtproteinkonzentration definiert wird, beträgt 45 %. Die aus dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts sind in Tab. 6 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb. 4 dargestellt.

#### Beispiel 8

921 kg wässrige Hydrophobin A-Lösung (TS = 2,3 gew-%, Hydrophobinkonzentration von 18 g/L) werden aufkonzentriert. Es resultieren 241 kg aufkonzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (TS = 9,6 gew-%, Hydrophobinkonzentration 98,3 g/L). Diese aufkonzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung wird einem Sprühwirbelbett (d = 150 mm, A = 0,177 m<sup>2</sup>) unter Vorlage von getrockneten Hydrophobin A zugeführt. Die Versprühung der aufkonzentrierten wässrigen Hydrophobin A-Lösung erfolgt über eine 2-Stoffdüse mit einem Durchmesser von 2 mm.

**Teil 1:** Es werden 2 kg Hydrophobin A aus Beispiel 4 vorgelegt. Die Einsprührate der konzentrierten wässrigen Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 1) wird in den Schritten 1,8 kg/h; 2,5 kg/h; 3,3 kg/h gesteigert. Die Gaseintrittstemperatur bei einer Produktein-sprührate von 3,3 kg/h beträgt 138 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 75 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprüh-

wirbelschicht beträgt 69 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 5,9 kg des Zulaufs 1 resultieren 0,44 kg Trockengut (Probe 1, Abb. 5).

5

**Teil 2:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 1 (1,5 kg, Korngröße der Vorlage < 1,25 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 2) mit einer Einsprührate von 3,2 kg/h versprüht. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 126 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 102 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 67 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 21,3 kg des Zulaufs 2 resultieren 1,6 kg Trockengut (Probe 2, Abb. 5).

15

**Teil 3:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 2 (1,3 kg) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 3) mit einer Einsprührate von 3,6 kg/h versprüht gesetzt. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 143 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 102 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 67 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 21,6 kg des Zulaufs 3 resultieren 1,6 kg Trockengut (Probe 3, Abb.5).

25

**Teil 4:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 3 (1,9 kg, Korngröße der Vorlage < 1,6 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 4) mit einer Einsprührate von 4,1 kg/h versprüht. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 147 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 100 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 66 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 24,6 kg des Zulaufs 4 resultieren 1,9 kg Trockengut (Probe 4, Abb. 5).

35

**Teil 5:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 4 (1,3 kg, Korngröße der Vorlage < 1,4 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 5)

mit einer Einsprührate von 4 kg/h versprüht. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 146 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 99 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 67 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 23 kg des Zulaufs 5 resultieren 1,7 kg Trockengut (Probe 5, Abb.5).

**Teil 6:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 5 (1,1 kg, Korngrösse der Vorlage < 1,25 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 6) mit einer Einsprührate von 3,5 kg/h versprüht. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 142 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 101 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 71 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 26,8 kg des Zulaufs 6 resultieren 2 kg Trockengut (Probe 6, Abb.5). Das Schüttgewicht der Nutzfraktion beträgt 0,65 kg/L.

**Teil 7:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 6 (1,2 kg, Korngrösse der Vorlage < 1,25 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin A-Lösung (= Zulauf 7) mit einer Einsprührate von 3,7 kg/h versprüht. Die mittlere Gaseintrittstemperatur beträgt 141 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 99 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 72 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 22,7 kg des Zulaufs 7 resultieren 1,7 kg Trockengut (Probe 7, Abb.5). Das Schüttgewicht der Nutzfraktion beträgt 0,65 kg/L. Die Fraktion zwischen 0,2-0,72 mm Korngröße beträgt 98,9%.

Für die Mahlung des Grobguts in diesem Beispiel ist neben dem Einsatz des Kornschneiders ein Walzenstuhl oder einer Mühle o.ä. geeignet.

Die aus dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts sind in Tab. 7 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb. 5 dargestellt.

**Beispiel 9**

894 kg wässrige Hydrophobin B-Lösung (TS = 2,4 gew-%, Hydrophobinkonzentration 6,3 g/L) werden aufkonzentriert. Es resultieren 226 kg aufkonzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (TS = 9,7 gew-%, Hydrophobinkonzentration 35,4 g/L).

**Teil 1:** Es werden 1 kg des Hydrophobin B-haltigen Trockengutes aus einer Sprühtrocknung analog zu Beispiel 5 vorgelegt. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 141 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 49 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 69 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 5 kg des Zulaufs 1 resultieren 0,46 kg Trockengut.

**Teil 2:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 1 (0,87 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 2) mit einer Einsprührate von 3,8 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 139 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 99 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 67 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 22,8 kg des Zulaufs 2 resultieren 2,1 kg Trockengut. Die Fraktion < 0,4 mm beträgt ca. 80 %.

**Teil 3** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 2 (0,87 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 3) mit einer Einsprührate von 3,8 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 140 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 102 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 69 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 30,1 kg des Zulaufs 3 resultieren 2,78 kg Trockengut. Die Fraktion zwischen 0,4-0,8 mm beträgt 80%.

**Teil 4:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 3 (1,1 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 4) mit einer Einsprührate von 3,5 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 142 DEG und der

dazugehörige Trocknungsgasstrom (Luft) 96 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 72 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 25,9 kg des Zulaufs 4 resultieren 2,4 kg Trockengut. Die Fraktion von 0,4-0,8 mm umfasst ca. 80 %.

**Teil 5:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 4 (1,1 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 5) mit einer Einsprührate von 3,4 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 139 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 99 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 72 DEG. Aus 26,6 kg des Zulaufs 5 resultieren 2,5 kg Trockengut. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Die Fraktion von 0,2-0,8 mm umfasst ca. 98 %.

**Teil 6:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 5 (1,1 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 6) mit einer Einsprührate von 3,4 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 142 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 98 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 72 DEG. Aus 25,4 kg des Zulaufs 6 resultieren 2,4 kg Trockengut. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Die Fraktion von 0,2-0,8 mm umfasst 91-95%. Das Schüttgewicht der Probe beträgt 0,57 kg/L.

**Teil 7:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 6 (1,4 kg, Korngröße < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 7) mit einer Einsprührate von 3,4 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 140 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 100 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 72 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngröße wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 18,4 kg des Zulaufs 7 resultieren 1,8 kg Trockengut. Die Fraktion von 0,2-0,4 mm ist > 0,64 kg/L.

**Teil 8:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 7 (1,2kg, Korngrösse < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 8) mit einer Einsprührate zwischen 3 und 2,5 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 120 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 100 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 67 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngrösse wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 21,5 kg des Zulaufs 8 resultieren 2,1 kg Trockengut (Abb. 6). Der Anteil der Fraktion zwischen 0,2-0,4 mm ist >70,5%.

**Teil 9:** Auf das im Wirbelbett verbleibende Trockengut aus Teil 8 (1,2 kg, Korngrösse < 0,8 mm) wird konzentrierte wässrige Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 3) mit einer Einsprührate von 4,1-4,4 kg/h versprüht. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 163 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 97 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 77 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngrösse wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 29,6 kg des Zulaufs 9 resultieren 2,8 kg Trockengut. Der Anteil der Fraktion zwischen 0,2-0,4 mm beträgt 14,8 %.

**Teil 10:** Es werden 1,3 kg des unter Teil 9 gemahlenen Grobguts zusammen mit dem Feingut vorgelegt (Korngrösse der Vorlage < 0,8 mm). Die Einsprührate der konzentrierten wässrigen Hydrophobin B-Lösung (= Zulauf 10) wird variiert zwischen 4,9 und 5,1 kg/h. Die Gaseintrittstemperatur beträgt 181 DEG und der dazugehörige Trocknungsgasstrom (Stickstoff) 95 m<sup>3</sup>/h. Die mittlere Produktaustrittstemperatur im unteren Bereich der Sprühwirbelschicht beträgt 82 DEG. Das Granulat wird über eine Austragsschnecke kontinuierlich ausgetragen. Die Korngrösse wird über die Siebung des Austrags und entsprechender Mahlung des Grobguts in einem Kornschneider gesteuert. Aus 43,1 kg des Zulaufs 10 resultieren 4,1 kg Trockengut (Probe 10, Abb. 6). Der Anteil der Fraktion zwischen 0,2-0,4 mm beträgt 12,6 %.

Die aus dem Aktivitätstest resultierenden Kontaktwinkel des wiedergelösten Hydrophobin-haltigen Trockenguts der Endprobe (Teil 10) sind in Tab. 8 aufgeführt. Das Proteingel des wiedergelösten Trockenguts ist in Abb. 6 dargestellt.

Tab. 1: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A mit Mannit.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 20,5        | 108,2         |
| <b>Beispiel 1</b> | 66,2        | 85,5          |

Tab. 2: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin B mit Mannit.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 21,1        | 108,6         |
| <b>Beispiel 2</b> | 68,3        | 78,2          |

5

Tab. 3: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A mit Natriumsulfat.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 15          | 110,8         |
| <b>Beispiel 4</b> | 64,9        | 86,3          |

Tab. 4: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A mit Maltodextrin.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 15          | 110,8         |
| <b>Beispiel 5</b> | 65,7        | 85,7          |

10

Tab. 5: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A ohne Hilfsstoff.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 15,5        | 107           |
| <b>Beispiel 6</b> | 65,9        | 85,6          |

Tab. 6: Kontaktwinkel nach Sprühtrocknung von Hydrophobin B ohne Hilfsstoff.

|                   | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 32,8        | 96,2          |
| <b>Beispiel 7</b> | 69,6        | 74,8          |

Tab. 7: Kontaktwinkel nach Sprühgranulierung von Hydrophobin A ohne Hilfsstoff.

| <b>Beispiel 8</b> | <b>Glas</b> | <b>Teflon</b> |
|-------------------|-------------|---------------|
| <b>Kontrolle</b>  | 13          | 97,8          |
| <b>Teil 1</b>     | 60,7        | 75,9          |
| <b>Teil 2</b>     | 62,2        | 81,2          |
| <b>Teil 3</b>     | 60,5        | 81,9          |
| <b>Teil 4</b>     | 60,9        | 62,5          |
| <b>Teil 5</b>     | 58,9        | 70,1          |
| <b>Teil 6</b>     | 60          | 72,5          |
| <b>Teil 7</b>     | 59,3        | 72,9          |

15

Tab. 8: Kontaktwinkel nach Sprühgranulierung von Hydrophobin B ohne Hilfsstoff.

|                                     | Glas | Teflon |
|-------------------------------------|------|--------|
| Kontrolle                           | 23,3 | 100,8  |
| Beispiel 9,<br>Endprobe, Teil<br>10 | 72,1 | 69,7   |

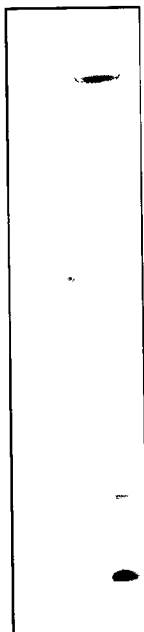
Erläuterung der Abbildungen:

- 5    Abb. 1: Proteingel Beispiel 1:  
       4-12% Bis-Tris Gel/MES Puffer, **links:** nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A mit Mannit, **rechts:** Marker: Prestained SDS-Page Standards, Auftrag/Slot: 15 µg Pr,  
       Abb. 2: Proteingel Beispiel 2:  
       Abb. 3: Proteingel Beispiel 6:
- 10    4-12% Bis-Tris Gel/MES Puffer, **links:** Marker: Prestained SDS-Page Standards, Auftrag/Slot: 15 µg Pr, **rechts:** nach Sprühtrocknung von Hydrophobin A ohne Hilfsstoff.  
       Abb. 4: Proteingel Beispiel 7:  
       4-12% Bis-Tris Gel/MES Puffer, **links:** Marker: Prestained SDS-Page Standards, Auftrag/Slot: 15 µg Pr, **mitte/rechts:** nach Sprühtrocknung von Hydrophobin B ohne Hilfs-
- 15    stoff.  
       Abb. 5: Proteingel Beispiel 8:  
       4-12% Bis-Tris Gel/MES Puffer, **links:** Marker: Prestained SDS-Page Standards, Auftrag/Slot: 15 µg Pr, **Rest:** Teile 1-7 nach Sprühgranulierung von Hydrophobin A ohne Hilfsstoff.
- 20    Abb. 6: Proteingel Beispiel 9:  
       4-12% Bis-Tris Gel/MES Puffer, **links:** Marker: Prestained SDS-Page Standards, Auftrag/Slot: 15 µg Pr, **rechts:** Probe 10 nach Sprühgranulierung von Hydrophobin B ohne Hilfsstoff

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von trockenen, freifliessenden, stabilen Hydrophobinzubereitungen durch Versprühen und Trocknen von gegebenenfalls Zusatzstoffe enthaltenden wässrigen Hydrophobinlösungen in einer Sprüheinrichtung.  
5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Hydrophobinlösung unter Mitverwendung von 5 bis 200 Gew.-%, bezogen auf den Hydrophobin-Feststoffgehalt der Lösung, eines organischen oder anorganischen Sprühhilfsmittels, versprüht und die so erhaltenen, mit Sprühhilfsmittel beladenen Teilchen trocknet.  
10
3. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Hydrophobinzubereitungen in Form von Granulaten, dadurch gekennzeichnet, dass zu der Sprüheinrichtung noch ein Wirbelbett verwendet wird.  
15
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Sprühhilfsmittel ein oder mehreren Zuckeralkohole, Cellulosen oder Stärke verwendet werden.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Sprühhilfsmittel Mannit verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Versprühung bei einer Zulufttemperatur zwischen 120 und 200°C erfolgt.  
25
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Versprühung bei einer Ablufttemperatur zwischen 50 und 120°C erfolgt.
8. Trockene, freifliessende, stabile Hydrophobinzubereitungen, erhältlich nach Anspruch 1.  
30

Fig 1/6



5 Abb. 1:

Fig 2/6

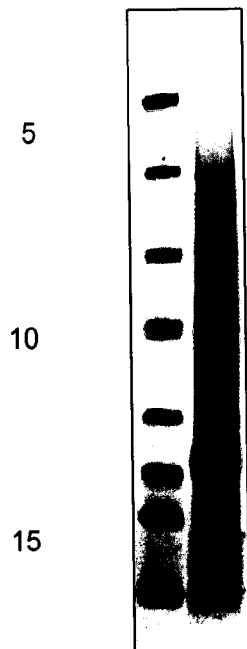
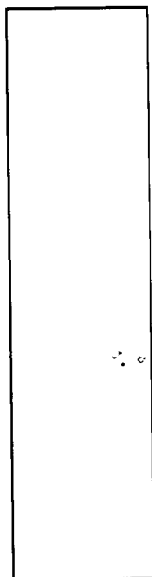


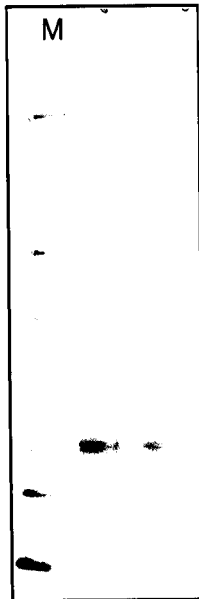
Abb. 2:

Fig 3/6



5 Abb. 3:

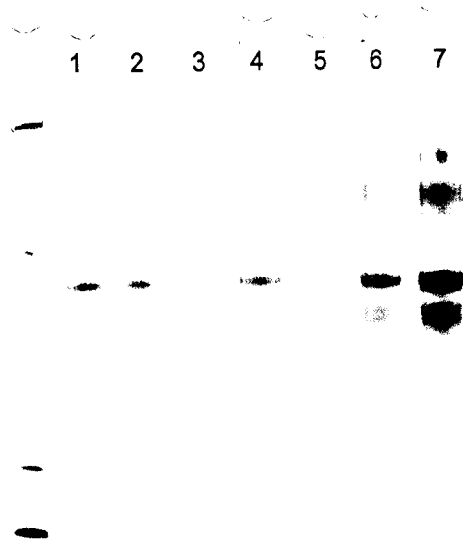
Fig 4/6



5

Abb. 4:

Fig 5/6



5

Abb. 5:

Fig 6/6

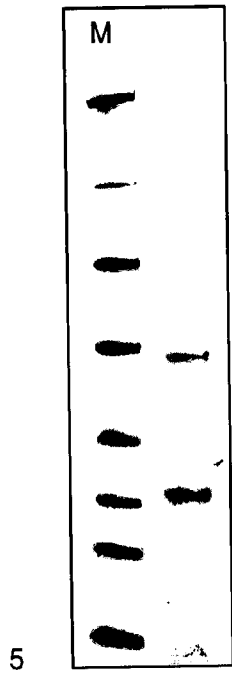


Abb. 6:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/058103

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. F26B3/08 B01J8/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
F26B B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                               | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | DE 41 19 281 A1 (BASF AG [DE])<br>17 December 1992 (1992-12-17)<br>cited in the application                      | 1-5,8                 |
| A         | the whole document                                                                                               | 6,7                   |
| Y         | US 2006/024417 A1 (BERRY MARK J [GB] ET<br>AL) 2 February 2006 (2006-02-02)<br>paragraphs [0008], [0036], [0055] | 1-5,8                 |
| A         | DD 263 790 A1 (INST GETREIDEVERARBEITUNG<br>[DD]) 11 January 1989 (1989-01-11)<br>cited in the application       |                       |
| A         | US 4 617 272 A (KIRKWOOD MARDIA K [US] ET<br>AL) 14 October 1986 (1986-10-14)<br>cited in the application        |                       |
|           | -----<br>-/--                                                                                                    |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2007

Date of mailing of the international search report

24/10/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, Berthold

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/058103

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | WO 01/57076 A (APPLIED NANOSYSTEMS B V [NL]; VOCHT MARCEL LEO DE [NL]; WOESTEN HERMAN) 9 August 2001 (2001-08-09)<br>-----                                                                                 |                       |
| A         | HEKTOR ET AL: "Hydrophobins: proteins with potential"<br>CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB,<br>vol. 16, no. 4, August 2005 (2005-08),<br>pages 434-439, XP005006169<br>ISSN: 0958-1669<br>----- |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/058103

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)    | Publication<br>date      |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------|
| DE 4119281                                | A1                  | 17-12-1992                    | CA 2070155 A1 13-12-1992 |
|                                           |                     | DK 522269 T3 17-04-2000       |                          |
|                                           |                     | EP 0522269 A2 13-01-1993      |                          |
|                                           |                     | JP 5153977 A 22-06-1993       |                          |
|                                           |                     | US 5318903 A 07-06-1994       |                          |
| US 2006024417                             | A1                  | 02-02-2006                    | AT 358996 T 15-05-2007   |
|                                           |                     | AU 2005266664 A1 02-02-2006   |                          |
|                                           |                     | AU 2005266665 A1 02-02-2006   |                          |
|                                           |                     | CA 2575319 A1 02-02-2006      |                          |
|                                           |                     | CA 2575325 A1 02-02-2006      |                          |
|                                           |                     | DE 602005000861 T2 30-08-2007 |                          |
|                                           |                     | WO 2006010425 A1 02-02-2006   |                          |
|                                           |                     | WO 2006010426 A1 02-02-2006   |                          |
|                                           |                     | US 2006024419 A1 02-02-2006   |                          |
| DD 263790                                 | A1                  | 11-01-1989                    | NONE                     |
| US 4617272                                | A                   | 14-10-1986                    | NONE                     |
| WO 0157076                                | A                   | 09-08-2001                    | AT 264342 T 15-04-2004   |
|                                           |                     | AU 3779501 A 14-08-2001       |                          |
|                                           |                     | CA 2399235 A1 09-08-2001      |                          |
|                                           |                     | DE 60102801 D1 19-05-2004     |                          |
|                                           |                     | DE 60102801 T2 21-04-2005     |                          |
|                                           |                     | DK 1257571 T3 02-08-2004      |                          |
|                                           |                     | EP 1257571 A1 20-11-2002      |                          |
|                                           |                     | JP 2003522187 T 22-07-2003    |                          |
|                                           |                     | US 2003166960 A1 04-09-2003   |                          |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/058103

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
INV. F26B3/08 B01J8/24

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
F26B B01J

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile            | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Y          | DE 41 19 281 A1 (BASF AG [DE])<br>17. Dezember 1992 (1992-12-17)<br>in der Anmeldung erwähnt                  | 1-5,8              |
| A          | das ganze Dokument                                                                                            | 6,7                |
| Y          | US 2006/024417 A1 (BERRY MARK J [GB] ET<br>AL) 2. Februar 2006 (2006-02-02)<br>Absätze [0008], [0036], [0055] | 1-5,8              |
| A          | DD 263 790 A1 (INST GETREIDEVERARBEITUNG<br>[DD]) 11. Januar 1989 (1989-01-11)<br>in der Anmeldung erwähnt    |                    |
| A          | US 4 617 272 A (KIRKWOOD MARDIA K [US] ET<br>AL) 14. Oktober 1986 (1986-10-14)<br>in der Anmeldung erwähnt    |                    |
|            | -----<br>-/--                                                                                                 |                    |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. September 2007

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/10/2007

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Rutz, Berthold

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/058103

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                                                                                         | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| A          | WO 01/57076 A (APPLIED NANOSYSTEMS B V [NL]; VOCHT MARCEL LEO DE [NL]; WOESTEN HERMAN) 9. August 2001 (2001-08-09)<br>-----                                                                                |                    |
| A          | HEKTOR ET AL: "Hydrophobins: proteins with potential"<br>CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB,<br>Bd. 16, Nr. 4, August 2005 (2005-08),<br>Seiten 434-439, XP005006169<br>ISSN: 0958-1669<br>----- |                    |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2007/058103

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 4119281                                         | A1                            | 17-12-1992                        | CA 2070155 A1 13-12-1992      |
|                                                    |                               | DK 522269 T3 17-04-2000           |                               |
|                                                    |                               | EP 0522269 A2 13-01-1993          |                               |
|                                                    |                               | JP 5153977 A 22-06-1993           |                               |
|                                                    |                               | US 5318903 A 07-06-1994           |                               |
| US 2006024417                                      | A1                            | 02-02-2006                        | AT 358996 T 15-05-2007        |
|                                                    |                               | AU 2005266664 A1 02-02-2006       |                               |
|                                                    |                               | AU 2005266665 A1 02-02-2006       |                               |
|                                                    |                               | CA 2575319 A1 02-02-2006          |                               |
|                                                    |                               | CA 2575325 A1 02-02-2006          |                               |
|                                                    |                               | DE 602005000861 T2 30-08-2007     |                               |
|                                                    |                               | WO 2006010425 A1 02-02-2006       |                               |
|                                                    |                               | WO 2006010426 A1 02-02-2006       |                               |
|                                                    |                               | US 2006024419 A1 02-02-2006       |                               |
| DD 263790                                          | A1                            | 11-01-1989                        | KEINE                         |
| US 4617272                                         | A                             | 14-10-1986                        | KEINE                         |
| WO 0157076                                         | A                             | 09-08-2001                        | AT 264342 T 15-04-2004        |
|                                                    |                               | AU 3779501 A 14-08-2001           |                               |
|                                                    |                               | CA 2399235 A1 09-08-2001          |                               |
|                                                    |                               | DE 60102801 D1 19-05-2004         |                               |
|                                                    |                               | DE 60102801 T2 21-04-2005         |                               |
|                                                    |                               | DK 1257571 T3 02-08-2004          |                               |
|                                                    |                               | EP 1257571 A1 20-11-2002          |                               |
|                                                    |                               | JP 2003522187 T 22-07-2003        |                               |
|                                                    |                               | US 2003166960 A1 04-09-2003       |                               |