

①9



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

①1 1007158

①2 C OCTROOI²⁰

②1 Aanvraag om octrooi: 1007158

②2 Ingediend: 29.09.97

⑤1 Int.Cl.⁶

C12P1/00, A23L1/27, C08F4/32,
C08J3/24, C08J5/18, C12P7/66,
C12P19/12, C12P21/00

④1 Ingeschreven:
30.03.99

④7 Dagtekening:
30.03.99

④5 Uitgegeven:
01.06.99 I.E. 99/06

⑦3 Octrooihouder(s):
Instituut voor Agrotechnologisch Onderzoek
(ATO-DLO) te Wageningen.

⑦2 Uitvinder(s):
Hindrik Jan Huizing te Wageningen
Cees van Dijk te Bennekom
Carmen Gabriela Boeriu te Wageningen

⑦4 Gemachtigde:
Ir. P.N. Hoorweg c.s. te 2517 GK Den Haag.

⑤4 Enzymatische modificatie.

- ⑤7 De uitvinding betreft een enzymatisch oxidatieproces, omvattende het samen brengen van een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor in een reactiemengsel en het in het reactiemengsel onder invloed van het enzym doen verlopen van een oxidatieve reactie met ten minste de waterstofacceptor en de waterstofdonor als substraat, waarbij eventueel verder een te crosslinken substraat in het reactiemengsel aanwezig is en de waterstofdonor dienst doet als crosslinkend agens hiervoor.
- In een eerste alternatieve uitvoeringsvorm wordt de waterstofdonor door het oxidatieve enzym omgezet in een radicaal, welke vervolgens dienst doet als initiator in de polymerisatie van tevens in het reactiemengsel aanwezige monomeren, in het bijzonder acrylaten.
- In een tweede alternatieve uitvoeringsvorm is de waterstofdonor een organisch kleurstofmolecuul, welke door de oxidatieve enzymatische reactie wordt gekoppeld aan een of meer andere organische kleurstofmoleculen.

NL C 1007158

De inhoud van dit octrooi komt overeen met de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekeningen.

ENZYMATISCHE MODIFICATIE

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op de enzymatische modificatie van verschillende substraten. De uitvinding betreft verder de producten, die door middel van deze chemische modificatie vervaardigd kunnen
5 worden en hun toepassingen.

Eiwitten van plantaardige en dierlijke oorsprong worden gebruikt in de voedings- en non food industrie. Met name dierlijke eiwitten hebben traditioneel verschillende toepassingen gekend in allerlei voedings-
10 middelen en op andere gebieden. Plantaardige eiwitten zijn in beginsel goedkoop en in overvloed verkrijgbaar maar hebben het nadeel dat ze vaak niet de voor een bepaalde toepassing gewenste functionele eigenschappen hebben. Hun gebruik in genoemde toepassingen is derhalve
15 steeds veel beperkter geweest.

De functionele eigenschappen van een eiwit hangen in het bijzonder samen met hun fysicochemische en structurele eigenschappen. Voor industriële toepassing van eiwitten is het vaak nodig een of meer van dergelijke
20 eigenschappen, zoals dispergeerbaarheid, kleur, schuimvormend vermogen, kleefsterkte, colloïdbeschermende eigenschappen, bevochtigbaarheid, molecuulgrootte of molecuulvorm te verbeteren of veranderen. Dit geldt zowel voor plantaardige als voor dierlijke eiwitten.

25 De chemische en enzymatische modificatie van eiwitten voor verschillende toepassingen is in de literatuur beschreven. Dergelijke modificaties zijn bijvoorbeeld het crosslinken van de afzonderlijke eiwitmoleculen met elkaar en/of andere moleculen. Het is het doel van de
30 uitvinding een ten opzichte van de bekende werkwijzen verbeterde modificatiemethode te verschaffen.

Zoals zal blijken uit de hierna volgende beschrijving van de uitvinding is de sleutelstap in de genoemde modificatiemethode tevens geschikt voor de
35 initiatie van de polymerisatie van bepaalde monomeren en voor de vervaardiging van nieuwe kleurstoffen.

Als sleutelstap in genoemde modificatiemethode verschaft de uitvinding een enzymatisch oxidatieproces,

omvattende het samen brengen van een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor in een reactiemengsel en het in het reactiemengsel onder invloed van het enzym doen verlopen van een oxidatieve reactie met
 5 tenminste de waterstofacceptor en de waterstofdonor als substraat. Dit enzymatisch oxidatieproces wordt in het onderstaande ook wel "sleutelproces" of "sleutelstap" genoemd.

Afhankelijk van de gewenste toepassing kunnen
 10 substraten worden toegevoegd en verschillende typen oxidatieve enzymen, waterstofdonoren en waterstofacceptoren worden gekozen.

Het actief samenbrengen van de componenten enzym, waterstofdonor, waterstofacceptor en eventueel een
 15 of meer andere substraten teneinde een modificatie van deze substraten te bewerkstelligen is niet eerder beschreven.

Geschikte enzymen zijn bijvoorbeeld peroxidases, in het bijzonder waterstofperoxidase, polyfenol-
 20 oxidase en lipoxygenase.

Bruikbare waterstofdonoren zijn met name fenolen, fenolzuren of fenolhoudende verbindingen, zoals bepaalde kleurstoffen, in het bijzonder alizarine en zijn afgeleiden, antocyanines, flavonoiden en dergelijke.

25 Waterstofacceptoren zijn bijvoorbeeld waterstofperoxide en zuurstof.

Indien bijvoorbeeld gestreefd wordt naar modificatie van eiwitten omvat het reactiemengsel verder een of meer eiwitten als te crosslinken substraat en doet de
 30 waterstofdonor dienst als crosslinkend agens hiervoor. De bijzondere voorkeur gaat uit naar fenolen, zoals catechol, of fenolzuren, zoals ferulinezuur, cafeïnezuur, coumarinezuur, vanillinezuur, tyrosine, coniferylalcohol, sinapylalcohol, kaneelzuur, p-coumarylalcohol, sinapine-
 35 zuur, p-hydroxybenzoëzuur, galluszuur en flavonoiden als crosslinkend agens.

Het te crosslinken substraat wordt bij voorkeur gevormd door een of meer van nature in water oplosbare

eiwitten en/of een of meer in water oplosbaar gemaakte eiwitten en/of mengsels hiervan met een of meer polysacchariden.

Van nature in water oplosbare eiwitten zijn
5 bijvoorbeeld ovalbumine, runderserumalbumine, cytochroom C, caseïne, collageen, gelatine, soja-eiwit, eiwitten uit groenten of granen, in het bijzonder gluten. De in water oplosbaar gemaakte eiwitten zijn bijvoorbeeld afkomstig uit aardappelen. Een geschikt polysaccharide is zetmeel.

10 De op deze wijze gemodificeerde (gecrosslinkte) eiwitten of mengsels van eiwitten met polysacchariden kunnen verschillende toepassingen hebben. Zo is het mogelijk van nature schuimende eiwitten, zoals ovalbumine en runderserumalbumine, zodanig te modificeren dat ze na
15 schudden in een waterige oplossing leiden tot de vorming van meer en stabiel schuim dan de niet gemodificeerde versies van deze eiwitten.

Ook de geleereigenschappen van sommige eiwitten kunnen door de modificatie duidelijk verbeterd worden. De
20 gels, die door de modificatie verkregen worden kunnen gebruikt worden als additief in desserts, als extrusie-hulpstof in diervoeders en dergelijke.

Eiwitcrosslinking of crosslinking van mengsels van eiwitten met polysacchariden volgens de uitvinding
25 kan verder leiden tot films, die betere eigenschappen hebben dan films vervaardigd van de overeenkomende niet-gecrosslinkte eiwitten of mengsels van eiwitten met polysacchariden. Dit zal in de voorbeelden verder worden geïllustreerd.

30 Welk type product (gel, schuim, film) uiteindelijk gevormd wordt hangt onder andere af van het gebruikte eiwit en de omstandigheden, enzymhoeveelheid en dergelijke.

Voor schuimvorming worden bij voorkeur eiwitten
35 met gunstige oppervlakte-actieve eigenschappen gebruikt, zoals ovalbumine of BSA, in combinatie met een relatief lage concentratie van het crosslinkend agens (ongeveer 0,5-1% ten opzichte van het eiwit) en een relatief hoge

concentratie waterstofperoxide (ongeveer 1,5% ten opzichte van het eiwit).

Voor de vervaardiging van gels en films worden caseïne-achtige eiwitten gebruikt met een hogere concentratie van het crosslinkend agens (ongeveer 1 tot 5% ten opzichte van het eiwit) en lagere concentraties waterstofperoxide (ongeveer 0,3-1,5% ten opzichte van het eiwit).

De producten, die worden verkregen met behulp van de werkwijze volgens de uitvinding, zijn door de aanwezigheid van crosslinkende moleculen in de uiteindelijke structuur anders dan soortgelijke producten, die zijn vervaardigd van eiwitten en/of polysacchariden zonder crosslinkende middelen. Zij verschillen zowel in samenstelling als in eigenschappen. Dergelijke nieuwe producten maken derhalve eveneens onderdeel uit van de onderhavige uitvinding.

Het systeem van een oxidatief enzym, zoals peroxidase, een waterstofdonor, zoals een fenol, en een waterstofacceptor, zoals waterstofperoxide, in combinatie met geschikt gekozen eiwitten, zoals caseïne, kan worden toegepast als additief in verven en lijmen, in stijfsel en kleefmiddelen.

Verrassenderwijs werd gevonden dat het sleutelproces volgens de uitvinding ook gebruikt kan worden voor de initiatie van polymerisatieprocessen, waarbij radicalen betrokken zijn. De waterstofdonor wordt in dat geval door het oxidatieve enzym omgezet in een radicaal, welke vervolgens dienst doet als initiator in de polymerisatie van tevens in het reactiemengsel aanwezige monomeren, in het bijzonder acrylaten.

In een andere variant kan het sleutelproces volgens de uitvinding worden toegepast in de vervaardiging van nieuwe kleurstofmoleculen, die stabiel zijn en minder gevoelig voor veranderingen in de pH. In dat geval is de waterstofdonor een organisch kleurstofmolecuul, welke door de oxidatieve enzymatische reactie wordt gekoppeld aan een of meer andere organische kleurstofmo-

leculen van dezelfde of een andere soort. Het oorspronkelijke organische kleurstofmolecuul is bijvoorbeeld alizarine of een afgeleide daarvan, een antocyaan of een flavonoïde. Voorbeelden zijn alizarine natriumsulfonaat, quercitine, myricetine, rutine.

De nieuwe kleurstoffen, die op deze wijze verkregen worden maken eveneens onderdeel uit van de onderhavige uitvinding.

De onderhavige uitvinding zal verder worden verduidelijkt aan de hand van de begeleidende voorbeelden, die slechts gegeven zijn ter illustratie.

VOORBEELDEN

VOORBEELD 1

Enzymatische modificatie van eiwitten

1.1. Het modificeren van eiwitten voor het verbeteren van hun schuimeigenschappen

Eiwitten met bekende schuimeigenschappen, zoals runderserumalbumine (BSA) en ovalbumine, werden behandeld met een systeem van peroxidase, waterstofperoxide en een waterstofdonor ten einde hun schuimcapaciteit en schuimstabiliteit te verhogen.

Een oplossing van 1% eiwit (10 mg/ml) werd bereid in 0,1 M fosfaatbuffer pH 7. Van deze oplossing werd 10 ml in een maatcilinder met een inhoud van 50 ml gebracht, en werden 0,056 mg catechol (0,56% ten opzichte van het eiwit) en 40 µl van een 0,00027% oplossing (0,001% ten opzichte van het eiwit) toegevoegd en voorzichtig gemengd met de eiwitoplossing. De enzymatische reactie werd gestart door toevoeging van 50 µl 30%-waterstofperoxide (1,5% ten opzichte van het eiwit) aan het reactiemengsel. Na vijftien minuten incubatie werd de oplossing gedurende 10 seconden geschud. Het volume van de vloeistof en van het gevormde schuim werden bepaald door directe aflezing. Om de schuimstabiliteit te bepalen werden de hoogten van respectievelijk het schuim en de vloeistof in de tijd gemeten op intervallen van 30 minuten.

In alle gevallen werden schuimen met hogere volumina en stabiliteit verkregen met het product volgens de uitvinding. De beste resultaten werden verkregen met ovalbumine. Wanneer ovalbumine werd geïncubeerd met
 5 peroxidase, waterstofperoxide en catechol, vertoonde de oplossing een donkerder kleur, maar het volume van het gevormde schuim was ongeveer zes maal groter dan met ovalbumine alleen. Het verkregen schuim onder deze omstandigheden was gedurende ten minste een week stabiel.
 10 Schuim dat verkregen werd met niet gemodificeerd ovalbumine bleef slechts gedurende een paar uur stabiel.

Om oplossingen en schuimen met een lichtere kleur te krijgen werd ascorbinezuur toegevoegd aan het reactiemengsel na de incubatie met catechol. Het schuim
 15 dat verkregen werd onder deze omstandigheden had een zeer lichte wit-geelachtige kleur en een hoog volume. Echter, de stabiliteit van het schuim verminderde tot dagen, maar het was nog steeds veel hoger dan de stabiliteit van het schuim dat geproduceerd was door middel van het niet
 20 gemodificeerde eiwit (figuur 1).

Schuim dat verkregen wordt uit gecrosslinkte eiwitten, en wordt gekenmerkt door een hoge stabiliteit, kan een toepassing vinden in de voedingsindustrie voor de productie van slagroom, mousses, soufflés en dergelijke.
 25

1.2. Modificatie van de eiwitten voor het verbeteren van geleereigenschappen

Enzymatische crosslinking volgens de uitvinding kan de gelering van biopolymeren, zoals eiwitten, verbeteren.
 30

Incubatie van 1% eiwitoplossing met 0,0136 mg of 0,00136 mg peroxidase (0,01-0,001% ten opzichte van het eiwit), 10 μ l 30%-waterstofperoxide (0,3% ten opzichte van het eiwit) en 0,62 mM fenol (1% ten
 35 opzichte van het eiwit) leidde tot gelering na 5 minuten voor runderserumalbumine of na 30 minuten voor ovalbumine. De kleur van beide oplossingen en gels varieerde van lichtgeel tot donkerbruin, afhankelijk van het gebruikte

type crosslinkend agens. Het gebruik van een hogere hoeveelheid eiwit voor de crosslinkingsreactie resulteerde in de vorming van gels met een hogere stevigheid en verbeterde eigenschappen. Deze gels kunnen in verschillende combinaties gebruikt worden voor de bereiding van desserts, als additief in diervoeder etc.

1.3. Vorming van eiwitfilms door enzymatische crosslinking

10 De biopolymeren (dat wil zeggen eiwitten en polysacchariden) die in de bovenstaande voorbeelden genoemd worden, werden ook gebruikt in de onderstaande experimenten. Alle experimenten werden uitgevoerd bij kamertemperatuur (23-25°C).

15 Eiwitoplossingen werden op verschillende manieren bereid, als functie van het type eiwit en de modificatiemethode. Een 10%-oplossing van caseïne (1 g caseïne/9 ml gedestilleerd water) wordt bereid door verhitting in een waterbad bij 60°C gedurende 30 minuten.

20 Oplossingen van aardappeleiwit werden op een andere manier bereid, omdat aardappeleiwit slecht oplosbaar is. Bovendien werden lagere concentraties aardappeleiwit gebruikt om eiwitoplossingen met een hoge viscositeit te vermijden. In een typisch experiment wordt 0,6 g
25 aardappeleiwit opgelost door het toevoegen van 12 ml 12% SDS. Aan deze oplossing wordt gedemineraliseerd water toegevoegd tot een eindvolume van 16 ml, gevolgd door 4 ml ethanol. In andere experimenten werden dispersies van gluten of aardappeleiwit gebruikt.

30 Zetmeeloplossing werd bereid door het toevoegen van 9 ml gedemineraliseerd water en 1 g zetmeel, het verhitten van het mengsel tot 80°C tot een ondoorzichtige oplossing wordt verkregen en het afkoelen tot kamertemperatuur. Na het afkoelen werd de oplossing gebruikt om
35 eiwit-zetmeelmengsels voor modificatie te gebruiken.

1.3.1. Caseïnefilms

In de crosslinkingsexperimenten werd als emulgator 0,2 g glycerol (1:5, w/w, glycerol:eiwit) aan de eiwitoplossing toegevoegd, gevolgd door toevoeging van 1 ml ethanol. Aan de oplossing werden hoeveelheden variërend van 10-55 mg van een opgelost crosslinkingsmiddel (5% ten opzichte van eiwit, w/w) en 10 μ l 30%-H₂O₂ (0,3% ten opzichte van het eiwit) toegevoegd onder voorzichtig mengen. Vervolgens werd vijf maal 2,72 μ g peroxidase (1:100000, enzym:eiwit) op intervallen van 1 minuut toegevoegd. Het reactiemengsel werd voorzichtig geroerd gedurende 15 minuten tot 2 uur en de eiwitfilms vervolgens gevormd door de oplossing te gieten op platen met een inwendige diameter van 8,5 cm of op vierkante platen van 12x12 cm. De films werden vervolgens geconditioneerd bij 20°C en 60% vochtigheid. De films worden getoond in figuur 2.

De samenstellingen van de films, hun wateroplosbaarheid, mechanische eigenschappen, waterdamp- en zuurstofpermeabiliteit van de films die op deze wijze bereid werden, werd gemeten. De resultaten staan in tabel 1. Om de waterdamppermeabiliteit van de eiwitfilms te verminderen werden experimenten uitgevoerd waarin de hydrofobiciteit van het eiwit gemodificeerd werd door toevoeging van chemische reagentia (bijvoorbeeld glutaraldehyde of lipiden) aan het reactiemengsel gedurende de enzymatische crosslinkingsexperimenten. De eigenschappen van deze films worden eveneens weergegeven in tabel 1.

De films die verkregen werden met enzymatisch gemodificeerd caseïne zwelden, maar losten niet op in water in vergelijking met films van niet gemodificeerd caseïne, die direct oplostten na toevoeging van water. Bovendien hebben de films die verkregen worden met gemodificeerd caseïne een lagere zuurstofpermeabiliteit en verbeterde mechanische eigenschappen in vergelijking met films die verkregen werden door gebruikmaking van niet gemodificeerd caseïne.

1.3.2. Caseïne-zetmeelfilms

Films van eiwit en zetmeel (als het gebruikte polysaccharide) werden op dezelfde wijze bereid als boven, met het verschil dat een deel van het eiwit vervangen werd door zetmeel (gewichtsverhouding eiwit:zetmeel variërend van 1:1 tot 1:2, 1:3, 1:4). De films werden gegoten, geconditioneerd bij 20°C en 60% vochtigheid en geanalyseerd voor het bepalen van de eigenschappen (zie tabel 1). De films worden getoond in figuur 3.

De op deze wijze verkregen films hebben betere eigenschappen dan die gemaakt zijn met niet gemodificeerd caseïne of niet gemodificeerd caseïne-zetmeelmengsels. De films van niet gemodificeerd caseïne of caseïne/zetmeel konden gemakkelijk opgelost worden door verhitting in water, terwijl de films verkregen uit gemodificeerd eiwit/zetmeel onoplosbaar waren in water en eveneens niet opgelost konden worden door koken in ether gedurende 1 uur of door behandeling met 10% SDS.

Bovendien werd in de oplossing, waarin de enzymatisch gemodificeerde caseïne-/zetmeelfilms gesuspenderd waren, de afwezigheid van zetmeel bewezen door de jodiumtest. In oplossingen, waarin films gevormd van niet gemodificeerde mengsels van zetmeel en eiwit gesuspenderd waren, was echter wel zetmeel aanwezig. Deze waarneming is een argument voor crosslinking van zetmeel met het eiwit door de oxidatieve peroxidase gekatalyseerde reactie.

De films bereid uit gemodificeerde zetmeel/eiwitmengsels hadden betere mechanische eigenschappen dan die welke verkregen werden uit niet gemodificeerd zetmeel-/eiwitmengsels.

1.3.3. Glutenfilms

Door de modificatie van gluten door enzymatische crosslinking op de boven gepresenteerde wijze konden onoplosbare films met uitstekende mechanische eigenschappen verkregen worden. Het interessantste resultaat was de vorming van een zeer goede film door het behandelen van

gluten door slechts een fenol en waterstofperoxide zonder het toevoegen van peroxidase. De verklaring is dat gluten van zichzelf reeds peroxidase bevat. De aanwezigheid hiervan werd experimenteel gedetecteerd en gekwantificeerd met een gemodificeerde versie van de ABTS-test (Arnao et al. (1995) Analytical Biochemistry 18, 335-338). Dit glutenperoxidase katalyseert de crosslinking van gluten in de aanwezigheid van de toegevoegde substraten (fenol en waterstofperoxide). Deze film had eigenschappen, die vergelijkbaar zijn met die van films, welke verkregen worden uit gemodificeerd gluten door de katalytische werking van toegevoegd mierikswortelperoxidase.

De films bereid door de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding kunnen toepassing vinden in coatings voor bijvoorbeeld kaas of voor fruit, dat wordt gebruikt in yoghurt en puddings etc., voor het coaten van papier.

Nummer	Ingrediënten	E_{mod} [MPa]	Stress [MPa]	Strain (%)	WVP [g/m.s.Pa]
CONTROLES :					
1	caseïne	1773 ± 89	34 ± 2	9 ± 5	14
2	caseïne + glycerol	65 ± 11	$3,1 \pm 0,2$	85 ± 8	16-17
3	caseïne + glycerol + H_2O_2	63 ± 9	$3,3 \pm 0,3$	85 ± 22	17-18
4	caseïne + glycerol + catechol + peroxidase	60 ± 6	$2,8 \pm 0,3$	82 ± 9	16
5	caseïne + glycerol + catechol + H_2O_2	63 ± 8	$2,9 \pm 0,3$	85 ± 14	18-19
6	caseïne + glycerol + zetmeel + H_2O_2	268 ± 69	$6,0 \pm 0,5$	28 ± 10	14
PEROXIDASE + GLYCEROL + H_2O_2 +:					
7	caseïne + catechol (systeem volgens de uitvinding)	81 ± 4	$4,5 \pm 0,5$	161 ± 18	15-17
8	caseïne + zetmeel	204 ± 18	$5,5 \pm 0,3$	39 ± 14	16-19
9	caseïne + ferulinezuur	491 ± 92	11 ± 2	33 ± 19	14-16
10	caseïne + vanillinezuur	237 ± 36	$8,6 \pm 0,6$	81 ± 11	13-14
11	caseïne + cafeïnezuur	442 ± 41	$10,9 \pm 0,4$	61 ± 14	15-16

1007158

5	12	caseïne + catechol + extra peroxidase	261±47	7,9±0,9	113±23	14-15
	13	caseïne + catechol bij 65°C	431±29	10,3±0,5	110±12	14-15
	14	caseïne + ferulinezuur bij 65°C	622±54	14,6±0,6	66±9	14-16
	15	caseïne + vanillinezuur bij 65°C	553±43	13±1	34±17	13-14
	16	caseïne + cafeïnezuur bij 65°C	585±66	13,6±0,8	64±23	15-16
10	17	caseïne + catechol 30 min. reactietijd	557±141	13,1±0,3	104±16	14-15
	18	caseïne + catechol 2 uur reactietijd	522±28	12,9±0,6	89±25	14
	19	caseïne + catechol 5 uur reactietijd	554±32	13±0,6	96±14	14
	20	caseïne + tyrosine	626±32	13,5±0,8	37±12	13-14
	21	caseïne + catechol + glutaaraldehyde	549±25	13,0±0,6	87±17	15
15	22	caseïne + glutaaraldehyde zonder enzym	825±153	17,8±0,1	47±15	16
	23	caseïne + catechol + stearinezuur	467±16	10,5±0,9	11±3	15-16
	24	caseïne + kaneelzuur	460±16	11,3±0,5	63±10	16
	25	caseïne + catechol + chitosan	505±46	11,6±0,6	50±19	16-17
	ANDERE ENZYMEN:					
20	26	caseïne + catechol + polyfenoloxidase	463±37	12,0±1	85±17	15
	27	caseïne + tyrosine + polyfenoloxidase	851±30	17,5±0,5	17±5	14-16
	28	caseïne + linoleenzuur + lipxygenase	804±74	17,8±0,3	21±11	14-15
	29	caseïne + catechol + linoleenzuur + lipxygenase	689±26	15,9±0,4	56±27	15

VOORBEELD 2Gecombineerde chemisch-enzymatische polymerisatie van organische monomeren

In de praktijk wordt de radicaalpolymerisatie van organische monomeren (bijvoorbeeld acrylaten, styreen) uitgevoerd bij temperaturen van ongeveer 70-80°C in aanwezigheid van een chemische initiator (bijvoorbeeld kaliumperoxidesulfaat of andere radicaal-precursorverbindingen).

In de methode volgens de onderhavige uitvinding wordt de polymerisatie geïnitieerd bij een temperatuur van 40°C door het enzymatisch oxidatieve systeem ("sleutelproces") volgens de uitvinding dat bestaat uit peroxidase, een fenol en waterstofperoxide. De fenolradicalen die gevormd worden door de chemische reactie worden gebruikt als initiatoren voor de radicaalpolymerisatie van acrylaten. De op deze wijze verkregen polymeren hebben een hogere molecuulmassa en betere mechanische eigenschappen dan die welke verkregen worden door middel van klassieke chemische polymerisatie.

In een reactievat worden 200 ml water en 0,2 g SDS gemengd. De oplossing wordt verhit tot 40°C en gedurende 1 uur doorborreld met stikstof om al het aanwezige zuurstof te verwijderen. Vervolgens wordt 12,5 ml butylacrylaat (0,078 mol) toegevoegd welke eerder gewassen was met 10% NaOH-oplossing om de hydroquinonremmer te verwijderen. De reactie wordt geïnitieerd door toevoeging van 8,8 mg ($8,74 \times 10^{-5}$ mol) catechol (opgelost in 5 ml water), 0,34 ml perhydrol (hydrogen peroxide) (10 mM in het reactiemengsel) en 12 mg mierikswortelperoxidase (opgelost in 1 ml water, overeenkomend met een verhouding (w/w) enzym:monomeer=1:10.000). Het mengsel wordt onder mengen gedurende anderhalf uur bij 40°C in reactie gebracht. Na voltooiing wordt de polymeer gescheiden en gegoten op een Petri-schaal.

Het zo verkregen polymeer heeft een molecuulgewicht van ongeveer 700.000 D in vergelijking met een

controlepolymeer verkregen door chemische polymerisatie die een molecuulgewicht heeft van 142.000 D.

VOORBEELD 3

5 Enzymatische methode voor de synthese van organische kleurstoffen

Peroxidase katalyseert de oxidatie van een verscheidenheid aan substraten in aanwezigheid van waterstofperoxide (of methyl- en ethylwaterstofperoxides). Een
 10 grote verscheidenheid aan organische verbindingen kan als substraat voor peroxidase dienen en zo de rol van waterstofdonor in radicaalreacties spelen. Deze categorie omvat onder andere fenolen, aromatische amines en dergelijke. Aangezien alizarine, een aantal van zijn afgelei-
 15 den, antocyaninen (**CORRECT ??**) en flavonoiden, een fenol-eenheid in het molecuul dragen, kunnen zij substraten zijn voor peroxidase. De verwachting is dat de vorming van een dimeer als resultaat van de radicaaloxidatie van elk van deze verbindingen een specifieke kleur zal hebben
 20 en ongevoelig zal zijn voor variaties in pH.

In dit experiment worden alizarine natriumsulfonaat, quercetine, myricetine en rutine gebruikt als substraten voor peroxidase. In een spectrofotometrische cuvette (d=1 cm) met 3 ml 0,05 M fosfaatbuffer van pH 6,1
 25 worden porties van de reagensoplossingen toegevoegd in de volgende volgorde: 5 μ l fenoloplossing en 40 μ l waterstofperoxideoplossing. Het mengsel wordt gehomogeniseerd door mengen en de reactie wordt geïnitieerd door toevoeging van 10 μ l peroxidaseoplossing. De spectra worden in
 30 de tijd opgenomen voor het spectraalgebied 230-800 nm (UV-VIS-spectrofotometer lambda 16, Perkin Elmer), ten opzichte van een referentie die slechts buffer bevat.

De concentraties van de reagentia in het reactiemengsel waren 5,6 μ g/ml peroxidase, 2,6 mM waterstofperoxide, $7,18 \times 10^{-4}$ M myricetine, ofwel $1,12 \times 10^{-4}$ M alizarine sulfonaat, ofwel $8,82 \times 10^{-5}$ M quercetine, ofwel $1,36 \times 10^{-4}$ M rutine. Voor elk experiment wordt het spectrum van de oplossing van fenolsubstraat opgenomen bij $\theta=0$ (θ is

1007158

tijd). Het eindpunt van de reactie wordt gemeten na ongeveer 24 uur.

Het verloop van de enzymatische oxidatie van verschillende kleurstoffen wordt getoond in tabel 2.

5

Tabel 2

Experiment	Substraat		Product		Reactieverloop
	$\lambda_{\max}$	kleur	$\lambda_{\max}$	kleur	
alizarine	260,8 333,6 518,4	rood-geel	na 1 uur: 260,8 332 420 516 na 24 uur: 260,8 420	geel- bruin	zeer langzame reactie
myricitine	252,8 368	geel	294 332,8	bruin (licht)	zeer snelle reactie
quercitine	253,6 365,6	geel	na 1 uur: 253,6 293,6 332,8 484,0 na 24 uur: 253,6 293,6 332,8 484	violet (na seconden) rood- bruin (na 1 uur) bruin (na 24 uur)	snelle reactie
rutine	255,2 352	geel	242,4 255,6 332,8	bruin	snelle reactie

10

CONCLUSIES

1. Enzymatisch oxidatieproces, omvattende het samen brengen van een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor in een reactiemengsel en het in het reactiemengsel onder invloed van het enzym doen
5 verlopen van een oxidatieve reactie met tenminste de waterstofacceptor en de waterstofdonor als substraat.

2. Proces volgens conclusie 1, waarbij verder een te crosslinken substraat in het reactiemengsel aanwezig is en de waterstofdonor dienst doet als crosslinkend
10 agens hiervoor.

3. Proces volgens conclusie 2, waarbij het te crosslinken substraat gevormd wordt door een of meer van nature in water oplosbare eiwitten en/of een of meer in water oplosbaar gemaakte eiwitten en/of mengsels hiervan
15 met een of meer polysacchariden.

4. Proces volgens conclusie 3, waarbij de van nature in water oplosbare eiwitten zijn gekozen uit ovalbumine, runderserumalbumine, cytochroom C, caseïne, collageen, gelatine, soja-eiwit, eiwitten uit groenten of
20 granen, in het bijzonder gluten.

5. Proces volgens conclusie 3, waarbij de in water oplosbaar gemaakte eiwitten afkomstig zijn uit aardappelen.

6. Proces volgens conclusie 3, waarbij het
25 polysaccharide zetmeel is.

7. Proces volgens conclusie 1, waarbij de waterstofdonor door het oxidatieve enzym wordt omgezet in een radicaal, welke vervolgens dienst doet als initiator in de polymerisatie van tevens in het reactiemengsel
30 aanwezige monomeren, in het bijzonder acrylaten.

8. Proces volgens conclusie 1, waarbij de waterstofdonor een organisch kleurstofmolecuul is, welke door de oxidatieve enzymatische reactie wordt gekoppeld aan een of meer andere organische kleurstofmoleculen.
35

9. Proces volgens conclusie 8, waarbij de organische kleurstofmoleculen zijn gekozen uit alizarine,

alizarine-afgeleiden, antocyanines, flavonoiden, in het bijzonder myricetine, quercitine, rutine.

10. Proces volgens een der conclusies 1-9, waarbij de waterstofdonor wordt gekozen uit fenolen, in
5 het bijzonder catechol, fenolzuren, in het bijzonder ferulinezuur, caffeïnezuur, coumarinezuur, vanillinezuur, tyrosine, coniferylalcohol, sinapylalcohol, kaneelzuur, p-coumarylalcohol, sinapinezuur, p-hydroxybenzoëzuur, galluszuur en flavonoiden, fenolhoudende verbindingen of
10 onverzadigde vetzuren, in het bijzonder linoleenzuur.

11. Proces volgens een der conclusies 1-10, waarbij de waterstofacceptor waterstofperoxide en/of zuurstof is.

12. Werkwijze voor het crosslinken van een of
15 meer eiwitten of mengsel van een of meer eiwitten met een of meer polysacchariden, omvattende het samen brengen van de eiwitten of het mengsel van eiwitten met polysacchariden met een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor in een reactiemengsel en het in het reac-
20 tiemengsel onder invloed van het enzym doen verlopen van een oxidatieve reactie, die leidt tot crosslinking van de eiwitten en/of de eiwitten met de polysacchariden.

13. Werkwijze volgens conclusie 12, **met het kenmerk**, dat de eiwitten van nature in water oplosbare
25 eiwitten zijn, in het bijzonder ovalbumine, runderserumalbumine, cytochroom C, caseïne, collageen, gelatine, soja-eiwit, eiwitten uit groenten of granen, in het bijzonder gluten, of in water oplosbaar gemaakte eiwitten, in het bijzonder eiwitten afkomstig zijn uit aardap-
30 pelen, waarbij het polysaccharide voor zover aanwezig zetmeel is, waarbij de waterstofdonor wordt gekozen uit fenolen, in het bijzonder catechol, fenolzuren, in het bijzonder ferulinezuur, caffeïnezuur, coumarinezuur, vanillinezuur, tyrosine, coniferylalcohol, sinapylalco-
35 hol, kaneelzuur, p-coumarylalcohol, sinapinezuur, p-hydroxybenzoëzuur, galluszuur en flavonoiden, fenolhoudende verbindingen of onverzadigde vetzuren, in het

bijzonder linoleenzuur en waarbij de waterstofacceptor waterstofperoxide en/of zuurstof is.

14. Werkwijze voor het polymeriseren van acrylaten, omvattende het in een reactiemengsel samenbrengen
5 van acrylaatmonomeren met een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor en het in het reactiemengsel onder invloed van het enzym doen verlopen van een oxidatieve reactie, teneinde de waterstofdonor om te zetten in een radicaal voor initiatie van de polymerisatie
10 tie van de monomeren, en het verder laten verlopen van de polymerisatie.

15. Werkwijze voor het vervaardigen van multimeren van kleurstofmoleculen, omvattende het in een reactiemengsel samenbrengen van een of meer fenolhoudende
15 kleurstoffen als waterstofdonor met een oxidatief enzym en een waterstofacceptor en het in het reactiemengsel onder invloed van het enzym doen verlopen van een oxidatieve reactie met de waterstofdonor als substraat voor het vervaardigen van multimeren van twee of meer kleurstofmoleculen.
20

16. Stabiel schuim, te verkrijgen door het proces volgens conclusies 1-4, 10 of 11 of de werkwijze volgens conclusie 12 uit te voeren met een van nature reeds schuimvormende eigenschappen bezittend eiwit, zoals
25 ovalbumine of runderserumalbumine.

17. Eiwitgel, te verkrijgen door het proces volgens conclusies 1-4, 10 of 11 of de werkwijze volgens conclusie 12 uit te voeren met een van nature reeds gelerende eigenschappen bezittend eiwit, zoals ovalbumine
30 of runderserumalbumine.

18. Eiwitfilm, te verkrijgen door het proces volgens conclusies 1-4, 10 of 11 of de werkwijze volgens conclusie 12 uit te voeren met een of meer eiwitten, zoals caseïne, of een mengsel van een of meer eiwitten en
35 een of meer polysacchariden, zoals zetmeel.

19. Kleurstofmolecuul, te verkrijgen door het uitvoeren van de werkwijze volgens conclusie 15.

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde L/SF68/MTC/4
Nederlandsse aanvraag nr. 1007158	Indieningsdatum 29 september 1997
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) ATO-DLO	
Datum van het verzoek voor een onderzoek van internationaal type --	Door de instantie voor Internationaal Onderzoek (ISA) aan het verzoek voor een onderzoek van internationaal type toegekend nr. SN 30063 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int.Cl. ⁶ : C 12 P 1/00, C 12 P 7/22, C 12 P 7/26, C 07 K 1/107, C 12 P 19/00, C 09 B 1/00, C 09 B 57/00, C 08 L 33/08, A 23 P 1/16	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.Cl. ⁶ :	C 12 P, C 07 K, C 09 B, C 08 L, A 23 P
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. ☐ GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. ☒ GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

1. conclusies: 1-6,12,13,16-18 en 10 en 11 partieel

Enzymatisch oxidatieproces met een oxidatief enzym, een waterstofacceptor, een waterstofdonor, waarbij één van de substraten een crosslinker kan zijn voor eventueel aanwezige eiwitten en/of polysacchariden. Schuim, eiwitgel en eiwitfilm daarbij gevormd.

2. conclusies: 7,14 en 10 en 11 partieel

Werkwijze waarbij het enzymatisch oxidatieproces van conclusie 1 wordt gebruikt voor het verkrijgen van een radicalaire initiator in een polymerisatiereactie.

3. conclusies: 8,9,15,19 en 10 en 11 partieel

Werkwijze waarbij het oxidatieproces van conclusie 1 wordt gebruikt om organische kleurstoffen te bereiden.

Het vooronderzoek werd tot het eerste onderwerp beperkt.

Enzymatische oxidatieprocessen, omvattende het samen brengen van een oxidatief enzym, een waterstofacceptor en een waterstofdonor in een reactiemengsel waarbij tenminste de waterstofacceptor (zoals waterstofperoxide en/of zuurstof) en de waterstofdonor (zoals fenolen en tyrosine) als substraat fungeren zijn algemeen bekend, zoals beschreven in de vernoemde documenten 1 t/m 9.

In het licht van deze stand der techniek kan het probleem van de onderhavige aanvraag gezien worden als verdere toepassingen van een enzymatisch oxidatieproces zoals beschreven in conclusie 1.

De onderhavige aanvraag bevat drie oplossingen voor dit probleem.

Een eerste oplossing is een werkwijze voor het crosslinken van een substraat zoals eiwitten en/of mengsels met polysacchariden om stabiele schuimen, eiwitgels en eiwitfilms te bekomen.

Een tweede oplossing is een werkwijze voor de bereiding van een radicalaire initiator in een polymerisatiereactie.

Een derde oplossing is de bereiding van organische kleurstofmoleculen.

Aangezien oxidatieprocessen zoals beschreven in conclusie 1 algemeen bekend zijn, aangezien de drie beschreven werkwijzen toepassingen zijn van een gekend oxidatieproces en mede doordat er geen verder technisch kenmerk kan gevonden worden dat, in het licht van de bekende stand der techniek, zou kunnen beschouwd worden als een

GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING

Octrooiaanvraag Nr.:

SN 30063

NL 1007158

AANVULLINGSBLAD B

De Instantie voor Nieuwheidsonderzoek heeft vastgesteld dat deze aanvraag meerdere uitvindingen bevat, te weten:

speciaal technisch kenmerk, is de ISA van mening dat er geen gemeenschappelijk inventief concept aanwezig is die de verschillende conclusies ondersteund volgens regel 13.1 PCT.

Bijgevolg ontbreekt er een eenheid in de aanvraag en worden de verschillende uitvindingen als verschillende onderwerpen geformuleerd in de mededeling volgens artikel 17(3)(a) PCT

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007158

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP

IPC 6 C12P1/00 C12P7/22 C12P7/26 C07K1/107 C12P19/00
C09B1/00 C09B57/00 C08L33/08 A23P1/16

Volgens de Internationale Classificatie van octrooien (IPC) of zowel volgens de nationale classificatie als volgens de IPC.

B. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK

Onderzochte minimum documentatie (classificatie gevolgd door classificatiesymbolen)

IPC 6 C12P C07K C09B C08L A23P

Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie, voor dergelijke documenten, voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen

Tijdens het internationaal nieuwheidsonderzoek geraadpleegde elektronische gegevensbestanden (naam van de gegevensbestanden en, waar uitvoerbaar, gebruikte trefwoorden)

C. VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
	EENHEID VAN UITVINDING ONTBREEKT zie aanvullingsblad B ---	
X	EP 0 682 116 A (AMANO PHARMA CO LTD) 15 November 1995 zie conclusies	1
X	WO 93 23606 A (NOVONORDISK AS ;HANSEN TOMAS TAGE (DK); NIELSEN PEDER HOLK (DK)) 25 November 1993 zie conclusies	1
X	US 4 900 671 A (POKORA ALEXANDER R ET AL) 13 Februari 1990 zie conclusies	1
X	FR 2 520 006 A (TOYO JOZO KK) 22 Juli 1983 zie conclusies --- -/--	1



Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.



Leden van dezelfde octrooifamilie zijn vermeld in een bijlage

* Speciale categorieën van aangehaalde documenten

A document dat de algemene stand van de techniek weergeeft, maar niet beschouwd wordt als zijnde van bijzonder belang

E eerder document, maar gepubliceerd op de datum van indiening of daarna

L document dat het beroep op een recht van voorrang aan twijfel onderhevig maakt of dat aangehaald wordt om de publicatiedatum van een andere aanhaling vast te stellen of om een andere reden zoals aangegeven

O document dat betrekking heeft op een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of een ander middel

P document gepubliceerd voor de datum van indiening maar na de ingeroepen datum van voorrang

T later document, gepubliceerd na de datum van indiening of datum van voorrang en niet in strijd met de aanvraag, maar aangehaald ter verduidelijking van het principe of de theorie die aan de uitvinding ten grondslag ligt

X document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet als nieuw worden beschouwd of kan niet worden beschouwd op inventiviteit te berusten

Y document van bijzonder belang; de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden aangevraagd kan niet worden beschouwd als inventief wanneer het document beschouwd wordt in combinatie met één of meerdere soortgelijke documenten, en deze combinatie voor een deskundige voor de hand ligt

Z document dat deel uitmaakt van dezelfde octrooifamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

16 Juni 1998

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van internationaal type

Naam en adres van de instantie

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

De bevoegde ambtenaar

Delanghe, L

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN		
Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
X	EP 0 481 815 A (MEAD CORP) 22 April 1992 zie conclusies ---	1
X	WO 97 19141 A (BIOINVICTA LIMITED ;NELSON GORDON (GB)) 29 Mei 1997 zie het gehele document ---	1-4, 11-13
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 1, 3 Juli 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 5653, PIERCE, JOHN A. ET AL: "A comparison of native and synthetic mushroom melanins by Fourier-transform infrared spectroscopy" XP002068270 zie samenvatting & PHYTOCHEMISTRY (1995), 39(1), 49-55 CODEN: PYTCAS;ISSN: 0031-9422, ---	1-4, 11-13
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 17, 25 Oktober 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 176413, ESHETE, FELEKE ET AL: "Characteristics of phenol oxidase of Schistosoma mansoni and its functional implications in eggshell synthesis" XP002068271 zie samenvatting & J. PARASITOL. (1993), 79(3), 309-17 CODEN: JOPAA2;ISSN: 0022-3395, ---	1-4, 11-13
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 94, no. 9, 2 Maart 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 60151, LEATHAM, GARY F. ET AL: "In vitro protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes" XP002068272 zie samenvatting & PHYTOPATHOLOGY (1980), 70(12), 1134-40 CODEN: PHYTAJ;ISSN: 0031-949X, ---	1-4, 11-13
A	EP 0 386 763 A (KANZAKI PAPER MFG CO LTD) 12 September 1990 zie conclusies ---	3
A	WO 93 20119 A (STOESS & CO GELATINE ;KOEPPF PETER (DE); BRAEUMER KLAUS (DE); BABE) 14 Oktober 1993 zie conclusies ---	3

	-/--	

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007158

C.(Vervolg). VAN BELANG GEACHTE DOCUMENTEN

Categorie *	Geciteerde documenten, eventueel met aanduiding van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie nr.
A	EP 0 302 734 A (OXYGENETICS INC) 8 Februari 1989 zie conclusies -----	3

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**
Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007158

In het rapport genoemd octrooigescrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP 0682116	A	15-11-1995	DE 69501228 D	29-01-1998
			DE 69501228 T	07-05-1998
			JP 8023971 A	30-01-1996
			US 5612208 A	18-03-1997

WO 9323606	A	25-11-1993	AT 142722 T	15-09-1996
			AU 665436 B	04-01-1996
			AU 4308993 A	13-12-1993
			CA 2136068 A	25-11-1993
			DE 69304696 D	17-10-1996
			DE 69304696 T	13-02-1997
			EP 0641403 A	08-03-1995
			FI 945408 A	17-11-1994
			JP 7506632 T	20-07-1995

US 4900671	A	13-02-1990	US 4647952 A	03-03-1987
			AT 124970 T	15-07-1995
			DE 3650351 D	17-08-1995
			DE 3650351 T	21-12-1995
			DE 3686153 A	27-08-1992
			EP 0245365 A	19-11-1987
			EP 0355868 A	28-02-1990
			JP 6068017 B	31-08-1994
			JP 63502079 T	18-08-1988
			WO 8702939 A	21-05-1987
			US 5153298 A	06-10-1992

FR 2520006	A	22-07-1983	JP 58126798 A	28-07-1983
			DE 3301655 A	08-09-1983

EP 0481815	A	22-04-1992	US 5147793 A	15-09-1992
			AT 155817 T	15-08-1997
			CA 2053547 A	19-04-1992
			DE 69126939 D	04-09-1997
			DE 69126939 T	12-02-1998
			JP 4262785 A	18-09-1992
			US 5112752 A	12-05-1992
			US 5188953 A	23-02-1993
			US 5178762 A	12-01-1993

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1007158

In het rapport genoemd octrooigeschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)		Datum van publicatie
WO 9719141	A	29-05-1997	AU	7583396 A	11-06-1997
EP 0386763	A	12-09-1990	JP	2236153 A	19-09-1990
			JP	2648361 B	27-08-1997
			JP	2255700 A	16-10-1990
			JP	2682867 B	26-11-1997
			DE	69012610 D	27-10-1994
			DE	69012610 T	09-03-1995
			US	5242793 A	07-09-1993
WO 9320119	A	14-10-1993	DE	4210334 A	07-10-1993
			AU	3747393 A	08-11-1993
			CA	2133105 A	01-10-1993
			DE	59302934 D	18-07-1996
			DK	633902 T	21-10-1996
			EP	0633902 A	18-01-1995
			ES	2088811 T	16-09-1996
			JP	7505417 T	15-06-1995
			US	5733994 A	31-03-1998
EP 0302734	A	08-02-1989	DE	3885030 D	25-11-1993
			DE	3885030 T	03-03-1994
			US	5005655 A	09-04-1991