

19



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

11 1004214

12 C OCTROOI²⁰

21 Aanvraag om octrooi: 1004214

22 Ingediend: 07.10.96

51 Int.Cl.⁶
B01J13/00, B01J19/06, C12P19/18,
A23L1/0522

41 Ingeschreven:
10.04.98

47 Dagtekening:
10.04.98

45 Uitgegeven:
02.06.98 I.E. 98/06

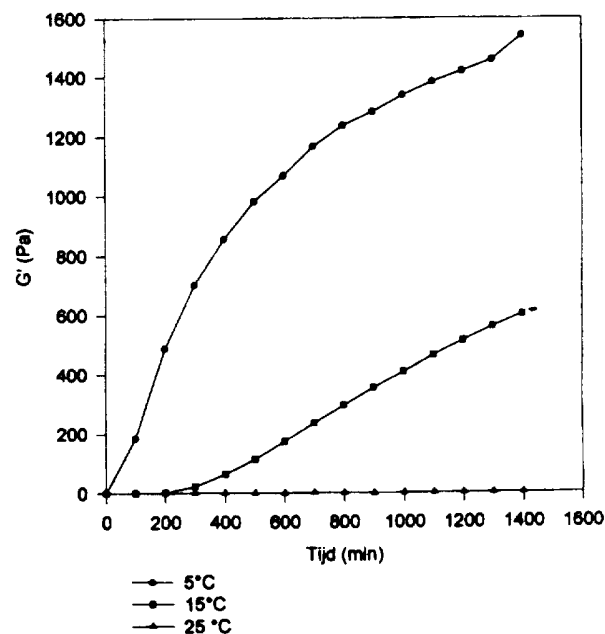
73 Octrooihouder(s):
Coöperatieve Verkoop- en Productievereniging
van Aardappelmeel en Derivaten AVEBE B.A. te
Veendam.

72 Uitvinder(s):
Gerrit Jan Willem Euverink te Groningen
Doede Jacob Binnema te Groningen

74 Gemachtigde:
Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s. te 2587 BN Den
Haag.

54 Toepassing van gemodificeerd zetmeel als middel voor het vormen van een thermoreversibele gel.

57 De uitvinding heeft betrekking op de toepassing van gemodificeerd zetmeel verkrijgbaar door amylose bevattend zetmeel in een waterige omgeving te behandelen met een enzym uit de groep van de α -1, 4- α -1,4-glycosyltransferasen (EC 2.4.1.25) of een enzym waarvan de activiteit overeenkomt met die van enzymen uit de zojuist genoemde groep, als middel voor het vormen van een thermoreversibele gel. Tevens heeft de uitvinding betrekking op produceren in de vorm van een thermoreversibel gel met als gelvormende stof een gemodificeerd zetmeel als gedefiniëerd. De uitvinding betreft ook nog de toepassing van een gemodificeerd zetmeel als gedefiniëerd in de vorm van een waterige oplossing.



NL C 1004214

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

Titel: Toepassing van gemodificeerd zetmeel als middel
voor het vormen van een thermoreversibele gel.

De uitvinding heeft betrekking op de toepassing van een op een bepaalde wijze gemodificeerd zetmeel als middel voor het vormen van een thermoreversibele gel.

Het is bekend zetmeel op allerlei wijzen te
5 modificeren. Afhankelijk van de uitgevoerde modificatie worden zetmeelproducten verkregen die voor uiteenlopende toepassingen kunnen worden gebruikt. Veel van de bekende zetmeelmodificaties leiden tot het verkrijgen van
10 betrekkelijk visceuze en daardoor moeilijk hanteerbare oplossingen. In andere gevallen kan wel een lage viscositeit worden bereikt, maar dan is het molecuulgewicht sterk verminderd, waardoor allerlei typische zetmeel-
15 karakteristieken verloren gaan.

Een ander probleem bij producten uit verstijfseld
15 zetmeel is retrogradatie, waarbij opgeloste amylosemoleculen geleidelijk en onomkeerbaar onoplosbaar worden. Een niet-retrogradeerbare zetmeeloplossing kan worden verkregen door zetmelen te gebruiken waarin geen amylose aanwezig is. Hiervoor kunnen amylopectine en amylose gescheiden worden
20 uit een willekeurige soort zetmeel, maar dit zijn bewerkelijke procedures. Amylosevrije zetmelen kunnen ook gewonnen worden uit speciale gewassen waarin geen amylose wordt gevormd. Deze gewassen dienen dan speciaal geteeld te worden. Niet-retrograderende zetmelen kunnen ook worden
25 verkregen door chemische derivatisering, maar daardoor worden vreemde groepen ingevoerd hetgeen zijn effect heeft op de eigenschappen van het zetmeel. Tenslotte kan retrogradatie ook worden voorkomen door de dextrose-equivalent (DE) van de zetmeeloplossing te verhogen middels
30 enzymatische hydrolyse, maar hierbij gaat het polymere karakter van het zetmeel achteruit en soms geheel verloren.

Het is verder bekend dat bepaalde zetmeelderivaten in staat zijn om zetmeelgelen te vormen, die diverse toepassingmogelijkheden bieden, maar tot dusver kunnen

zetmeelgelen slechts worden verkregen bij tamelijk hoge concentraties van ten minste 10 %, zoals bekend uit Carbohydrate Polymers 231 (1993), 243-248.

Thans is gevonden dat een op een bepaalde wijze gemodificeerd zetmeel uitstekend geschikt is voor het vormen van een thermoreversibele gel.

Voorts is gevonden dat een aldus gemodificeerd zetmeel reeds in een lage concentratie in staat is om een thermoreversibele gel te vormen.

10 Tevens kenmerkt het volgens de uitvinding toe te passen gemodificeerde zetmeel zich door een lage viscositeit in waterige oplossing, waardoor het product gemakkelijk te hanteren en te verwerken is en een dergelijke waterige oplossing voor talrijke toepassingen kan worden gebruikt.

15 Zeer opmerkelijk is dat het volgens de uitvinding toe te passen gemodificeerde zetmeel nagenoeg identiek is aan het uitgangsmateriaal wat betreft het gemiddelde molecuulgewicht, het reducerende vermogen (DE) en het vertakkingspercentage. De polymere eigenschappen blijven dus in stand, terwijl er ook geen toename is van de oxidatiegevoelige plaatsen (DE blijft praktisch ongewijzigd).

In overeenstemming met de hierboven omschreven doelstellingen wordt de uitvinding hierdoor gekenmerkt, dat een gemodificeerd zetmeel verkrijgbaar door amylose bevattend zetmeel in een waterige omgeving te behandelen met een enzym uit de groep van de α -1,4- α -1,4-glucosyltransferasen (EC 2.4.1.25) of een enzym waarvan de activiteit overeenkomt met die van enzymen uit de zojuist genoemde groep - al deze enzymen worden hierna kortweg glucosyltransferase genoemd - wordt toegepast als middel voor het vormen van een thermoreversibele gel. De typische en hier van belang zijnde activiteit van glucosyltransferasen is dat zij in staat zijn om een α -1,4 binding tussen twee glucose-eenheden te verbreken om daarna een nieuwe α -1,4 binding te maken.

Voorts wordt de uitvinding gekenmerkt door de toepassing van gemodificeerd zetmeel als hierboven gedefiniëerd in de vorm van een waterige oplossing die, zoals gezegd, een relatief lage viscositeit heeft.

5 De term "zetmeel" omvat hier zowel natief zetmeel als niet gesubstitueerde zetmeelderivaten. Met deze laatste worden zetmelen bedoeld die zijn verkregen door natief zetmeel partiëel af te breken door zure en/of enzymatische hydrolyse tot een DE van maximaal 5, omdat anders het
10 polymere karakter van het zetmeel verloren gaat. Het zetmeel voor gebruik bij de omzetting met glucosyltransferase dient, zoals gezegd, amylose te bevatten, bij voorkeur in hoeveelheid van ten minste 5 gew.%. Daarnaast dient het uitgangszetmeel tevens amylopectine te bevatten, dat evenwel
15 van nature steeds in zetmeel aanwezig is. Amylose en amylopectine bevattende natieve zetmelen zoals aardappelzetmeel, maïszetmeel, tarwezetmeel, rijstzetmeel en tapiocazetmeel evenals niet gesubstitueerde derivaten daarvan kunnen dus als uitgangszetmeel worden gebruikt.

20 De te gebruiken glucosyltransferasen kunnen uit verschillende organismen worden verkregen. Uit de literatuur is het bekend dat deze enzymen voorkomen in vertegenwoordigers van de Eukarya en de Bacteria. Voorts is bekend dat glucosyltransferasen ook aanwezig zijn in
25 vertegenwoordigers van de Archae. Bij voorkeur wordt een glucosyltransferase gebruikt dat bestand is tegen een tamelijk hoge temperatuur, bijvoorbeeld een temperatuur van rond 70°C. Voorbeelden hiervan zijn glucosyltransferasen uit *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima* en uit thermofiele
30 vertegenwoordigers van de Archae. Maar ook niet thermostabiele glucosyltransferasen uit bijvoorbeeld de aardappel of *Escherichia coli*, respectievelijk D-enzym en amyloamylase, zijn toepasbaar bij het uitvoeren van de uitvinding. Het enzym dient zo nodig te worden gezuiverd van
35 enzymatische componenten die een ongewenste aantasting of afbraak van het zetmeelmolecuul kunnen veroorzaken. Aldus dient het enzym in hoofdzaak vrij te zijn van contaminerende

α -amylase-activiteit. Aan een deskundige is het bekend hoe een dergelijke zuivering kan worden uitgevoerd.

De enzymatisch omzetting met glucosyltransferase kan zowel worden uitgevoerd met verstijfseld zetmeel als met
5 zetmeel dat zich nog in korrelvorm bevindt, maar dan in opgezwollen toestand of, anders gezegd, dat slechts ten dele verstijfseld is. In het eerste geval kan het glucosyltransferase worden toegevoegd aan de reeds
10 verstijfselde zetmeeloplossing, nadat deze bijvoorbeeld tot de gewenste reactietemperatuur is afgekoeld. In het tweede geval kan het glucosyltransferase op ieder gewenst moment aan de zemeelsuspensie worden toegevoegd.

De reactieomstandigheden voor het uitvoeren van de enzymatische omzetting zijn afhankelijk van het gebruikte
15 glucosyltransferase en kunnen door de deskundige gemakkelijk worden bepaald. In de praktijk wordt gewoonlijk gewerkt bij of nabij een pH waarbij het enzym optimale activiteit heeft. Naarmate meer enzym wordt toegepast verloopt de omzetting sneller en ook een hogere temperatuur bevordert de beoogde
20 enzymatisch omzetting. Uiteraard dient bij het kiezen van de temperatuur rekening te worden gehouden met de thermische stabiliteit van het toegepaste glucosyltransferase. Wanneer een tamelijk thermostabiel enzym wordt gebruikt wordt de enzymatische omzetting bij voorkeur uitgevoerd bij en
25 temperatuur in het gebied van 60-75 °C. De voortgang van de omzetting kan worden gevolgd aan de hand van de verlaging van de viscositeit. Nadat de gewenste viscositeitsverlaging is bereikt kan de omzetting worden afgebroken. Bij voorkeur wordt de omzetting echter voortgezet tot geen verdere
30 viscositeitsverlaging meer optreedt.

Nadat de gewenste enzymatische omzetting heeft plaatsgevonden kan het enzym desgewenst worden geïnactiveerd door het reactiemengsel te verhitten. Indien is uitgegaan van een zetmeelsuspensie kan deze dan tevens worden omgezet
35 in een oplossing. Desgewenst kan het al dan niet geïnactiveerde enzym ook door aan de deskundige bekende technieken, zoals door dialyse, uit het reactiemengsel

worden afgescheiden. Voor bepaalde toepassingen kan de aanwezigheid van glucosyltransferases immers niet zijn toegestaan. De verkregen zetmeeloplossing kan desgewenst worden geconcentreerd of het droge gemodificeerde zetmeel
5 kan als poeder worden gewonnen. Ook kunnen volgens behoefte wasbehandelingen worden uitgevoerd, zoals met koud water en met oplossingen met oplopende concentraties aan ethanol, waarna droging kan plaatsvinden.

Een waterige oplossing van een met glucosyltransferase gemodificeerd zetmeel bezit de eigenschap bij afkoeling een
10 gel te vormen, die door de temperatuur te verhogen weer overgaat in een oplossing. Het gaat hier dus om een thermoreversibele gel en de uitvinding is precies gericht op de toepassing van een gemodificeerd zetmeel dat op de
15 beschreven wijze kan worden verkregen, als thermoreversibele gel. Dit thermoreversibele gedrag doet zich reeds voor bij een lage concentratie van bijvoorbeeld rond 3 gew.% gemodificeerd zetmeel, zodat wanneer dit thermoreversibele gedrag volgens de uitvinding wordt benut, reeds met een
20 kleine hoeveelheid van het gemodificeerde zetmeel kan worden volstaan.

Zoals reeds aangestipt, heeft een waterige oplossing van een met glucosyltransferase gemodificeerd zetmeel een lage viscositeit. Een waterige oplossing van ongeveer
25 10 gew.% heeft namelijk een aanzienlijk lagere viscositeit dan een 10 gew.%'s oplossing van niet gemodificeerd zetmeel. Hierdoor is het product zeer gemakkelijk te verwerken. Voorts zijn het gemiddelde molecuulgewicht, het reducerende vermogen (DE) en het vertakkingspercentage praktisch
30 ongewijzigd gebleven ten opzichte van het uitgangsmateriaal. Hieruit kan worden afgeleid dat er een herschikking tussen de verschillende typen zetmeelmoleculen onderling heeft plaatsgevonden zonder dat er oxidatiegevoelige plaatsen of stukken met een reducerende werking zijn bijgekomen.
35 Tenslotte blijkt er weinig of geen retrogradatie op te treden, zodat het om een bijzonder stabiel product gaat.

Een op de aangegeven wijze door enzymatische omzetting gemodificeerd zetmeel kan voor talrijke toepassingen worden gebruikt waarbij de eigenschap tot het vormen van een thermoreversibele gel van nut of van belang kan zijn, zoals
5 in voedingsmiddelen, cosmetica, farmaceutica, detergentia, kleefstoffen en boorvloeistoffen. Deze toepassingen zijn op zichzelf aan de deskundige bekend, zodat hier niet verder hoeft te worden op ingegaan. Voor deze toepassingen zijn de stabiliteit van het gemodificeerde zetmeel alsmede het feit
10 dat de beoogde thermoreversibele werking reeds bij een lage concentratie van bijvoorbeeld slechts rond 3 gew.% kan worden bereikt, belangrijke voordelen. Welke hoeveelheid in een specifiek geval een optimale werking oplevert kan door de deskundige gemakkelijk proefondervindelijk worden bepaald.
15 De uitvinding zal hieronder aan de hand van voorbeelden nader worden toegelicht.

Voorbeeld 1

(Zuivering van de thermostabiele glucosyltransferase uit
20 *Thermus thermophilus*)

De activiteit van de glucosyltransferase werd bepaald door de hoeveelheid gevormd glucose te bepalen uit maltotriose bij 70°C en pH 6,5 in 50 mM maleaat buffer. De activiteit werd uitgedrukt in μmol glyucose gevormd per
25 minuut per milligram eiwit (Units per mg)

- Stap 1: De thermofiele gram-negatieve eubacterie *Thermus thermophilus* HB8 werd gekweekt in een 40 l fermentor met een werkvolume van 35 l. Het groeimedium bevatte (per liter):
50 g gistextract; 50 g casaminozuren; 10 g sucrose; 2,5 g
30 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g MgCl_2 ; 6,2 g K_2HPO_4 ; 2,2 g NaH_2PO_4 . Er werd gekweekt bij een temperatuur van 70°C en de pH werd met 2 M NaOH op pH 7,0 gehouden. Antischuim werd toegevoegd om schuimvorming te verminderen. Na de fermentatie werden de cellen verzameld door middel van crossflow-filtratie en
35 centrifugatie. De cellen werden ingevroren bij -20°C. Voor de zuivering werden 40 g cellen (natgewicht) ontdooid en werd 1 mg DNase toegevoegd. Dit werd gesonificeerd gedurende

14 x 20 sec; 9 mm probe, 18 Watt. Tussen de cycli werd 40 sec gewacht. Celresten werden verwijderd d.m.v. centrifugatie (60 min; 30.000 x g) Het supernatant werd voorzichtig afgeschonken. De viskeuze pellet werd nog eens
5 gewassen met 50 mM Tris-HCl pH 7,5 en opnieuw gecentrifugeerd. De twee supernatanten werden bij elkaar gevoegd en gebruikt als celvrij extract (140 ml).

- Stap 2: Het celvrije extract werd verdeeld over 10 reageerbuizen en 5 min geïncubeerd bij 90°C.
10 Geprecipiteerd materiaal werd verwijderd d.m.v. centrifugatie (15 min; 17.000 x g rpm).

- Stap 3: Materiaal van stap 2 werd op 30% (verzadiging) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (23,0 g) gebracht en 15 min geïncubeerd bij 4°C. Het geprecipiteerde materiaal werd verwijderd d.m.v.
15 centrifugatie (15 min; 17.000 x g) en het supernatant (150 ml) werd op 60% (verzadiging) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (27,2 g) gebracht. Na 15 min incubatie bij 4°C werd de pellet, verkregen d.m.v. centrifugatie (15 min; 17.000 x g) opgelost in 25 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 en overnacht gedialyseerd
20 tegen 11 van dezelfde buffer.

- Stap 4: Het gedialyseerde materiaal van stap 3 (40 ml) werd verdeeld in twee porties van 20 ml. Elke portie werd apart gescheiden door middel van MonoQ (HR 10/10) (Pharmacia) anion-wisselingschromotografie. Niet bindende
25 eiwitten werden uit de kolom gewassen totdat de A_{280} van het eluens lager was dan 0,05. Gebonden eiwitten werden geëluëerd met een 240 ml gradiënt van 0 tot 0,5 M NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (4 ml/min; fractie: 4 ml). De fracties van de beide scheidingsstappen waarin zich de hoogte glucosyltransferase-activiteit bevond werden samengevoegd.
30

- Stap 5: Materiaal van stap 4 werd overnacht gedialyseerd tegen 1 ml 20 mM Tris-HCl pH 6,8 met 0,25 M NaCl. Het materiaal werd gebonden aan een chelating Superose HR (10/2) (Pharmacia), geladen met koper-ionen volgens het voorschrift
35 van de fabrikant. Niet bindende eiwitten werden uit de kolom gewassen totdat de A_{280} lager was dan 0,05. Gebonden eiwitten werden geëluëerd met een 30 ml gradiënt van 0 tot 3,0 M

NH₄Cl in 20 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,25 M NaCl (1 ml/min; fractie: 1 ml). De fracties waarin zich de hoogste glucosyltransferase-activiteit bevond werden samengevoegd.

5 - Stap 6: Materiaal van stap 5 werd op een Superdex 200 HR (26/60) (Pharmacia) gelfiltratiekolom gebracht en geëlueerd met 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl. (2,5 ml/min; fractie: 5 ml). De fracties waarin zich de hoogste glucosyltransferase-activiteit bevond werden samengevoegd.

10 - Stap 7: Materiaal van stap 6 werd op 1,7 M (NH₄)₂SO₄ gebracht en op een alkyl Superose HR (5/5) (Pharmacia) gebracht. Niet bindende eiwitten werden uit de kolom gewassen totdat de A₂₈₀ lager was dan 0,05. Gebonden eiwitten werden geëlueerd met een 25 ml gradiënt van 1,7 M tot 0 M (NH₄)₂SO₄ in 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (1 ml/min; fractie: 1 ml).
15 De fracties waarin zich de hoogste glucosyltransferase-activiteit bevond werden samengevoegd en overnacht gedialyseerd tegen 25 mM Tris-HCl pH 7,5 en bewaard bij 4°C.

De op deze wijze verkregen glucosyltransferase heeft een maximale activiteit bij een temperatuur van 75°C en bij
20 pH 6,5. Het molecuulgewicht ligt tussen 43 en 54 kDa en het enzym is actief als monomeer. De eerst 35 N-terminale aminozuren werden bepaald. De volgorde werd bepaald als zijnde: MELPRAFGLL LHPTSLPGPY GVGVLGQEAR DFLRF (1 letter code).

25 Voorbeeld 2

(Modificering van verstijfseld zetmeel met een thermostabiel enzym)

Een suspensie van aardappelzetmeel (20 gew.% amylose; 80 gew.% amylopectine; aldus ook in de volgende voorbeelden
30 tenzij anders is aangegeven) in 50 mM natriumcitraat pH 6,5 (10 gew.% droge stof) werd in een jet-cooker verstijfseld bij 150°C. De resulterende viskeuze suspensie werd afgekoeld tot 70°C en de pH werd opnieuw gesteld op 6,5. Vervolgens werd aan 8 l van de suspensie 1 mg van een gezuiverd
35 glucosyltransferase zoals verkregen in voorbeeld 1 toegevoegd. Daarna werd de oplossing gedurende enkele uren geïncubeerd totdat de viscositeit een constante waarde had

bereikt (figuur 1). De viscositeitsverandering werd gevolgd via registratie van het voltage dat nodig was om het toerental van de roermotor constant te houden.

Voorbeeld 3

5 (Modificering van verstijfseld zetmeel met een thermolabiel enzym).

Aardappelzetmeel werd verstijfseld door een 5% zetmeelsuspensie 10 min. te incuberen bij 100°C. De resulterende viskeuze suspensie werd afgekoeld tot 30°C en
10 aan 5 ml van de suspensie werd 40 µg aardappel D-enzym toegevoegd. Het reactiemengsel werd 48 uur geïncubeerd bij 30°C.

Voorbeeld 4

(Modificering van gezwollen zetmeelkorrels met een
15 thermostabiel enzym)

Een 5% suspensie van aardappelzetmeel (5 ml) werd gemengd met 2 µg *T. thermophilus* glucosyltransferase uit voorbeeld 1 en verwarmd tot 70°C, waarna verder werd geïncubeerd totdat de viscositeit constant was (ca. 24 uur).
20 Bij 70°C is de korrelstructuur van het gezwollen aardappelzetmeel zeer goed zichtbaar. Na inwerking van de glucosyltransferase is de korrelstructuur volledig verdwenen, terwijl zonder glucosyltransferase de korrelstructuur nog steeds zeer goed zichtbaar was (figuur 2
25 is een fase-contrast opname (200x) van aardappelzetmeel (A) en glucosyltransferase gemodificeerd aardappelzetmeel (B) bij 70°C).

Voorbeeld 5

(Karakterisering van het met glucosyltransferase
30 gemodificeerde zetmeel)

Aan het gemodificeerde zetmeel uit de voorbeelden 2, 3 en 4 werden enkele analyses uitgevoerd. Als referentie werd verstijfseld (2%; 20 min; 120°C) aardappelzetmeel meegenomen.

35 De joodabsorptiespectra van de in de voorbeelden 2, 3 en 4 gevormde producten waren identiek aan elkaar, maar ten

1004214

opzichte van het uitgangsmateriaal (aardappelzetmeel) was het absorptiemaximum verschoven van 620 nm naar 540 nm (figuur 3). Er is tevens vergeleken met het joodabsorptiespectrum van amylosevrij aardappelzetmeel (amylopectine).

De molecuulgewichtsverdeling van met *T. thermophilus* glucosyltransferase uit voorbeeld 1 gemodificeerd oplosbaar aardappelzetmeel (Merck), bepaald met behulp van gelfiltratiechromatografie (Superdex 200) en joodabsorptiespectrum (figuur 4, deel B), was veranderd ten opzichte van het uitgangsmateriaal (figuur 4, deel A). De aanwezigheid van twee pieken in deel B van figuur 4 wijst erop dat een overzetting heeft plaatsgevonden, terwijl het gemodificeerde product een groot molecuulgewicht heeft behouden.

Het vertakkingspercentage (de verhouding tussen het aantal α -1,6 bindingen en het aantal α -1,4 bindingen bepaald met behulp van het enzym isoamylase, dat de α -1,6 bindingen verbreekt, waardoor een extra reducerende groep ontstaat; de toename van het aantal reducerende groepen door de werking van isoamylase is een maat voor het aantal α -1,6 bindingen of vertakkingspunten) en het reducerende vermogen waren slechts in geringe mate veranderd ten opzichte van het uitgangsmateriaal (vertakkingspercentage: 2,86% tegenover 2,77% bij het uitgangsmateriaal; reducerende gehalte: 0,00293 tegenover 0,00288 bij het uitgangsmateriaal) De zijketenlengteverdeling was wél veranderd ten opzichte van het uitgangsmateriaal zoals na onttakking kan worden waargenomen (figuren 5 en 6). Figuur 5 toont het elutieprofiel van onttakt aardappelzetmeel (A) en onttakt glucosyltransferase gemodificeerd aardappelzetmeel (B). De oligosacchariden werden gescheiden op een Dionex HPLC en gedetecteerd m.b.v. een Pulsed Amperometrische Detector. De getallen boven de pieken geven de lengte van de oligosacchariden aan. Figuur 6 toont het elutiepatroon van onttakt aardappelzetmeel en onttakt glucosyltransferase

1004214

gemodificeerd aardappelzetmeel dat werd gescheiden op een gelfiltratie kolom (Superdex 200).

Voorbeeld 6

(Vorming van een gel)

5 De oplossing verkregen in voorbeeld 2 werd gekoeld tot 4°C en verder geïncubeerd totdat een witte gel was ontstaan. Dit materiaal werd achtereenvolgens gewassen met water en met 25%, 50%, 75% en 100% ethanol. Het aldus verkregen
10 materiaal werd aan de lucht gedroogd en vermalen tot een poeder met een gemiddelde grootte van ca 200 µm. Er werd ca 500 g met glucosyltransferase gemodificeerd aardappelzetmeel verkregen.

Voorbeeld 7

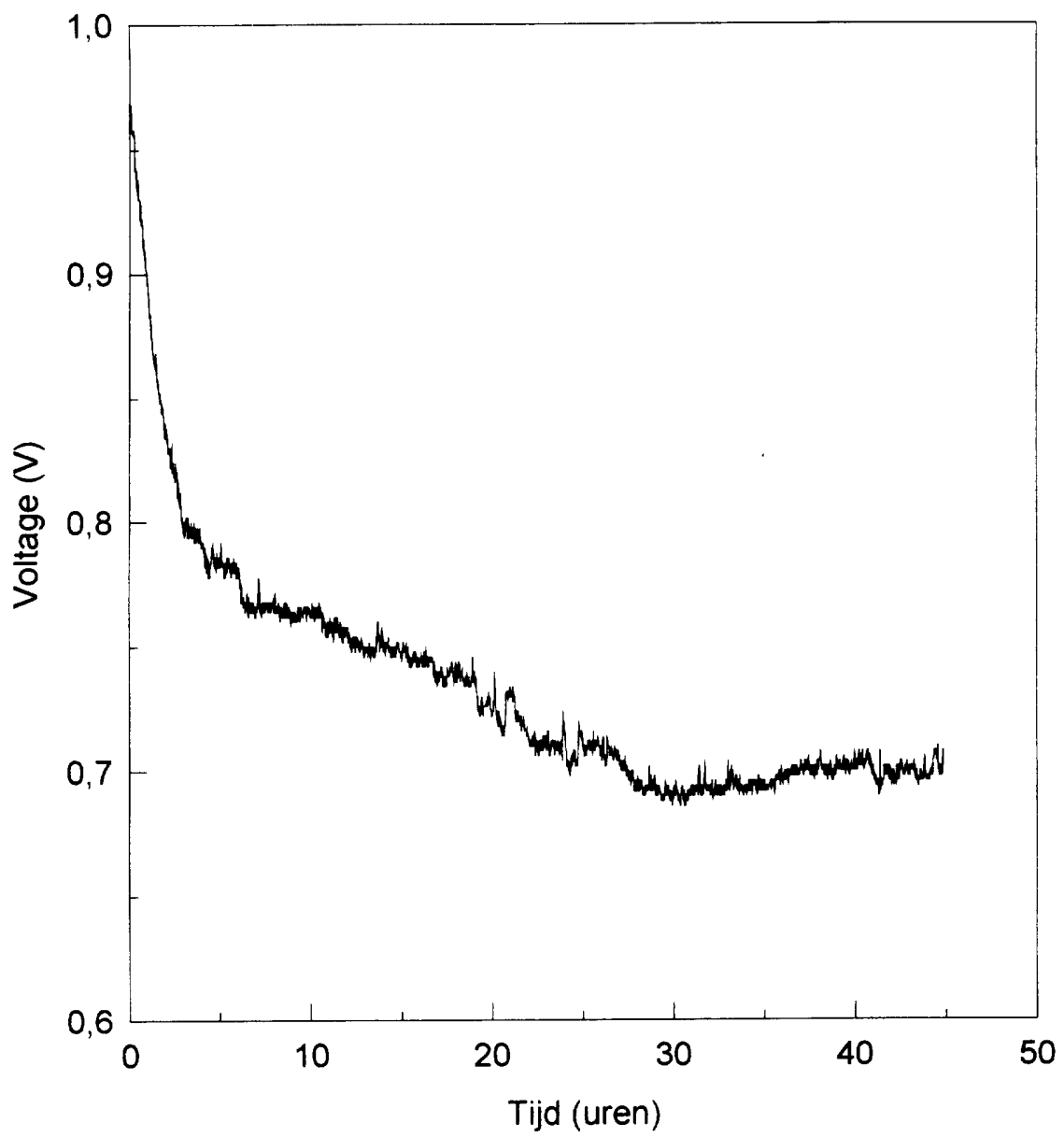
(Thermoreversibiliteit en vorming van de gel)

15 Met materiaal verkregen volgens voorbeeld 6 werd een 5%'s waterige suspensie bereid en deze werd verwarmd bij 90°C totdat een heldere oplossing was verkregen. Deze oplossing werd in een rheometer afgekoeld tot 4°C en G' (G") werd gevolgd in de tijd (voor G' en G" zie "Inleiding in de
20 Reologie" 1991, ISBN 90 201 2557 5, blz. 177-189). Nadat G' constant was werd de temperatuur verhoogd tot 70°C en daarna werd opnieuw afgekoeld tot 4°C. Dit proces werd drie maal herhaald. Als blanco werd een 3%'s aardappelzetmeeloplossing meegenomen. Figuur 7 is een hypothetische weergave van de
25 geconstateerde verandering van de viscositeit (G') van glucosyltransferase gemodificeerd aardappelzetmeel (deel A) en van aardappelzetmeel (deel B) na drie cycli van verwarmen en afkoelen. Deel A vertoont duidelijk het gedrag van thermoreversibele gel.

30 Uitgaande van een 5% 's waterige suspensie als in dit voorbeeld beschreven werd de vorming van de gel nagegaan, waarbij werd geconstateerd dat deze bij tamelijk lage temperaturen van 15°C en lager gebeurt (figuur 8, die de gelvorming (toenemende G') toont van glucosyltransferase
35 gemodificeerd aardappelzetmeel bij verschillende temperaturen).

CONCLUSIES

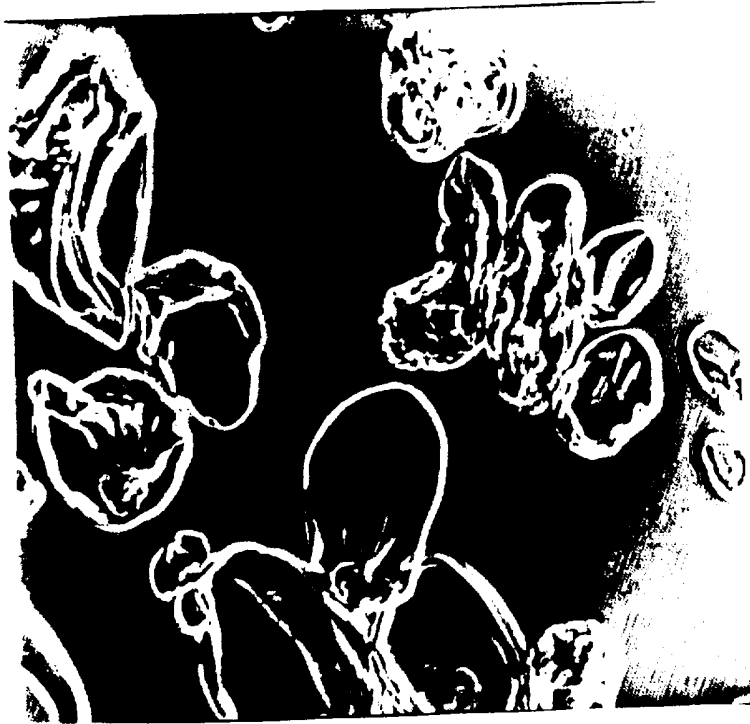
1. Toepassing van gemodificeerd zetmeel verkrijgbaar door amylose bevattend zetmeel in een waterige omgeving te behandelen met een enzym uit de groep van de α -1,4- α -1,4-glucosyltransferasen (EC 2.4.1.25) of een enzym waarvan de
5 activiteit overeenkomt met die van enzymen uit de zojuist genoemde groep, als middel voor het vormen van een thermoreversibele gel.
2. Toepassing volgens conclusie 1, waarbij het te gebruiken enzym in hoofdzaak vrij is van enzymatische componenten die
10 een ongewenste aantasting van het zetmeelmolecuul kunnen veroorzaken.
3. Toepassing volgens conclusie 1 of 2; waarbij het amylose bevattende zetmeel aardappel-, maïs-, tarwe-, rijst- of tapiocazetmeel is
- 15 4. Toepassing volgens conclusies 1-3, waarbij het gemodificeerde zetmeel aanwezig is in een concentratie van ten minste 3 gew.%.
5. Product in de vorm van een thermoreversibele gel, waarbij het product als gelvormende stof een gemodificeerd zetmeel
20 bevat dat verkrijgbaar is als beschreven in conclusies 1-3.
6. Product volgens conclusie 5, waarbij de gelvormende stof aanwezig is in een concentratie van ten minste 3 gew.%.
7. Product volgens conclusie 5 of 6, waarbij het product behoort tot de groep gevormd door voedingsmiddelen,
25 cosmetica, farmaceutica, detergentia, kleefstoffen en boorvloeistoffen.
8. Toepassing van gemodificeerd zetmeel als gedefinieerd in conclusies 1-3 in de vorm van een waterige oplossing.



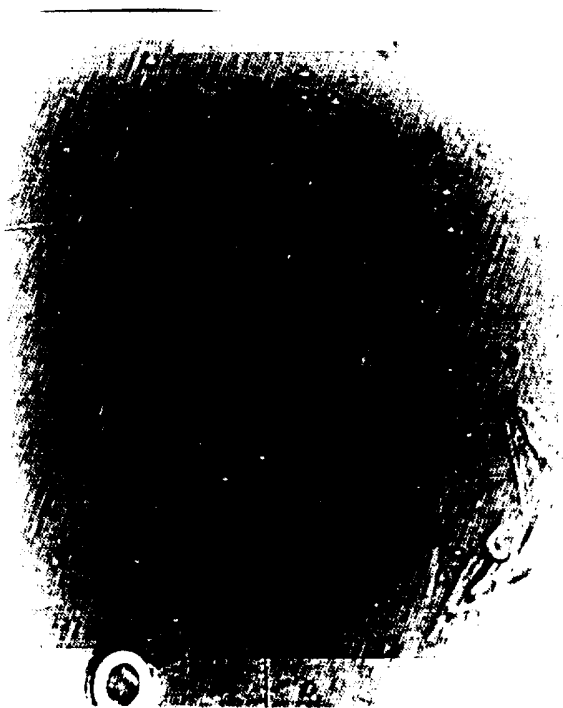
Figuur 1

1004214

A

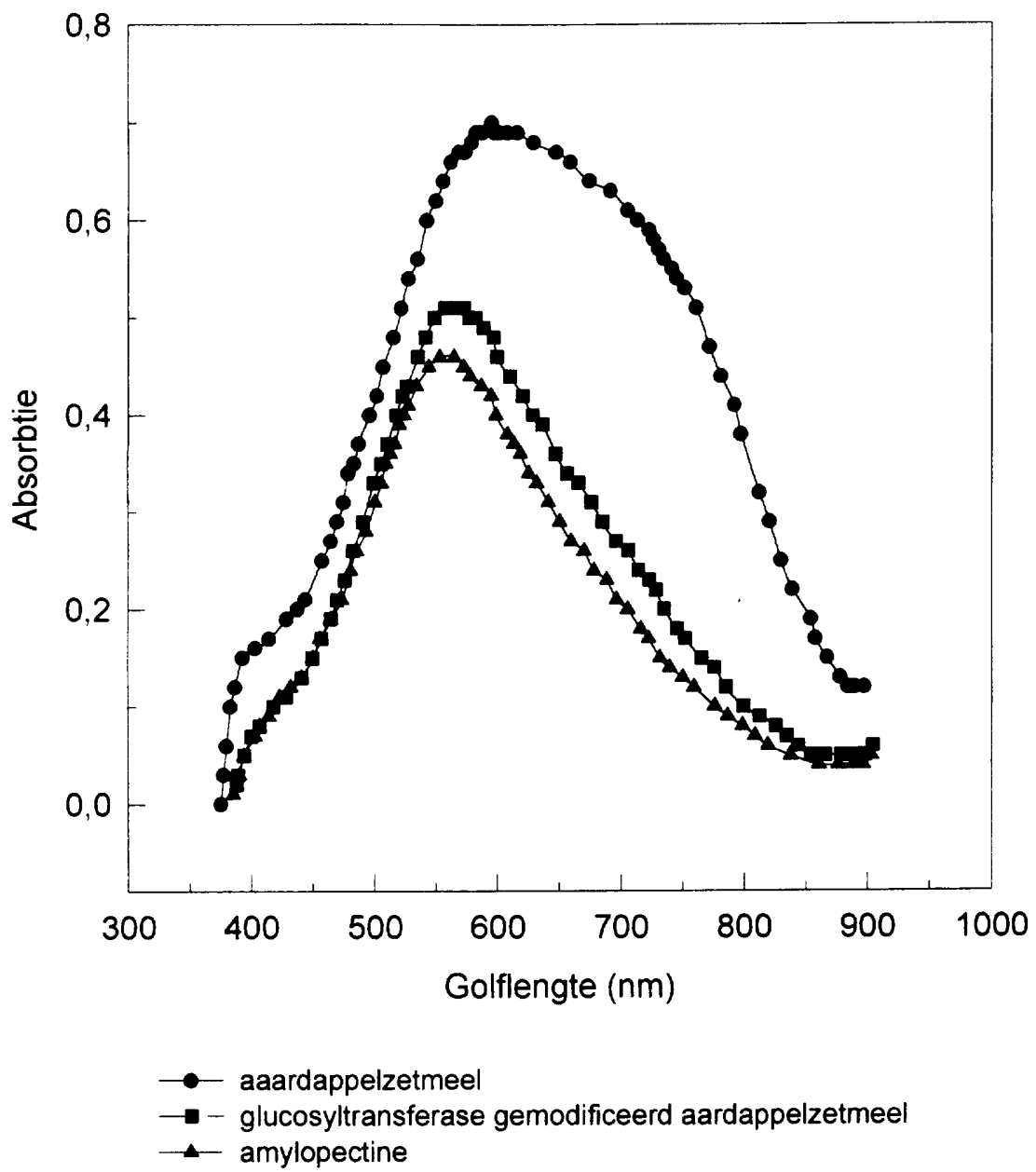


B



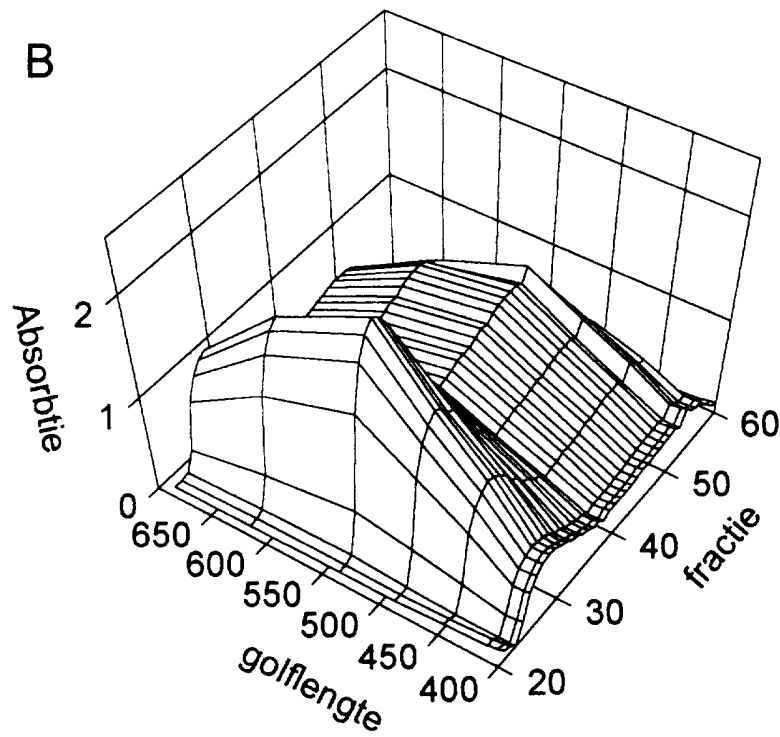
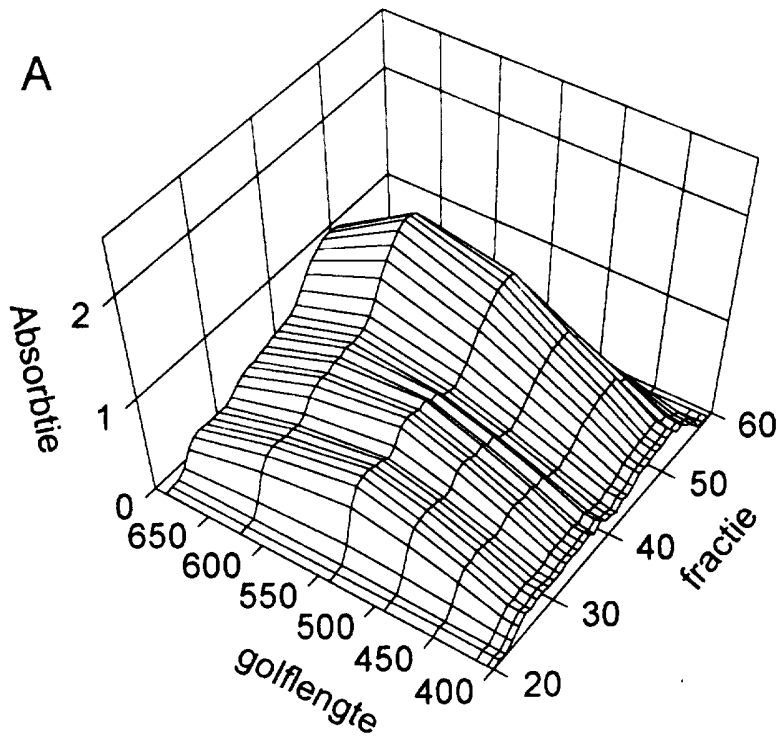
Figuur 2

1004214



Figuur 3

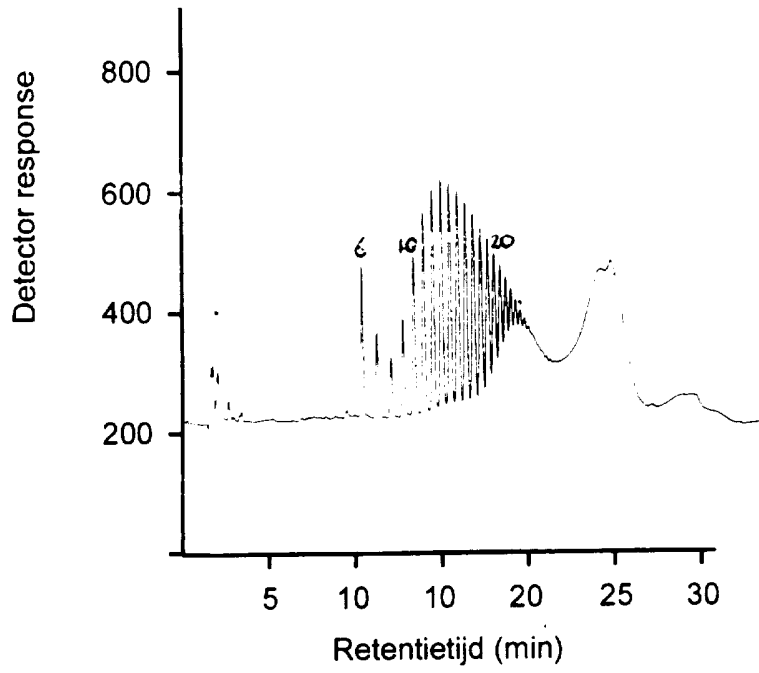
10 0 4 2 1 4



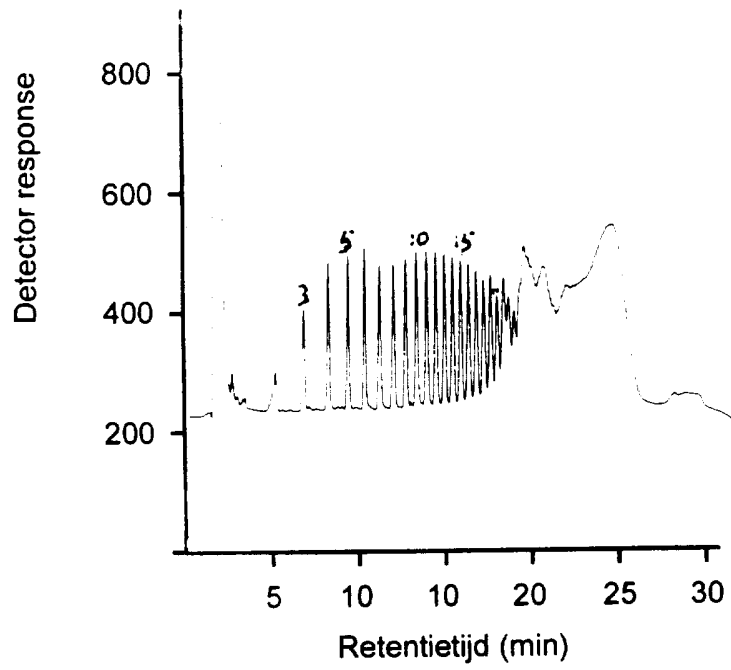
Figuur 4

1004214

A

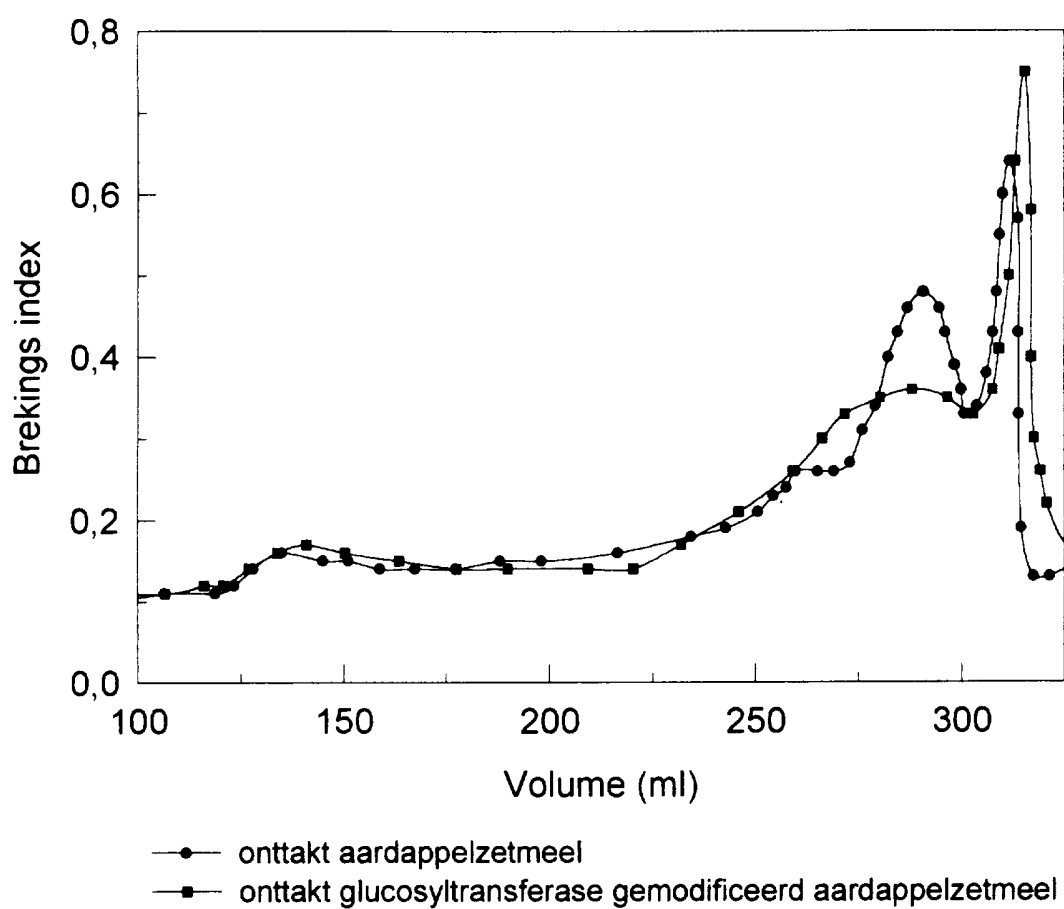


B



Figuur 5

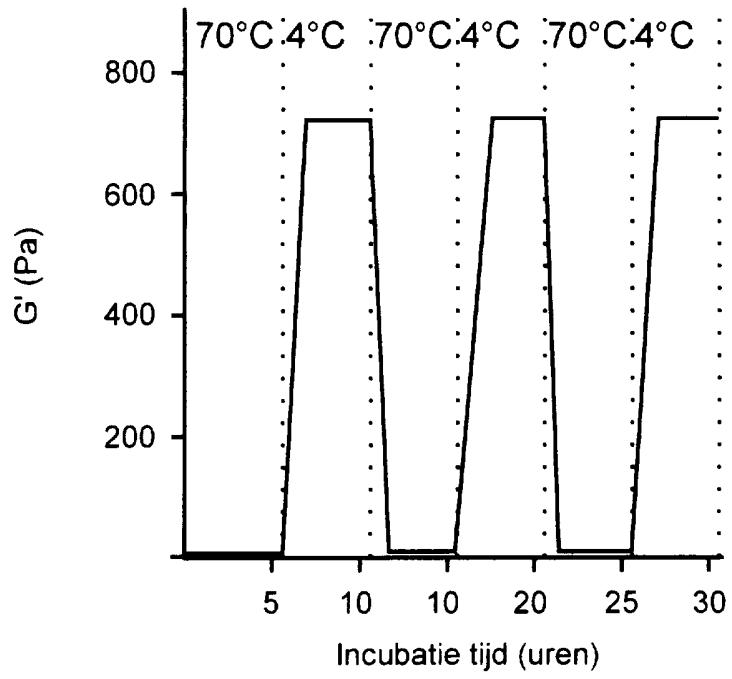
1004214



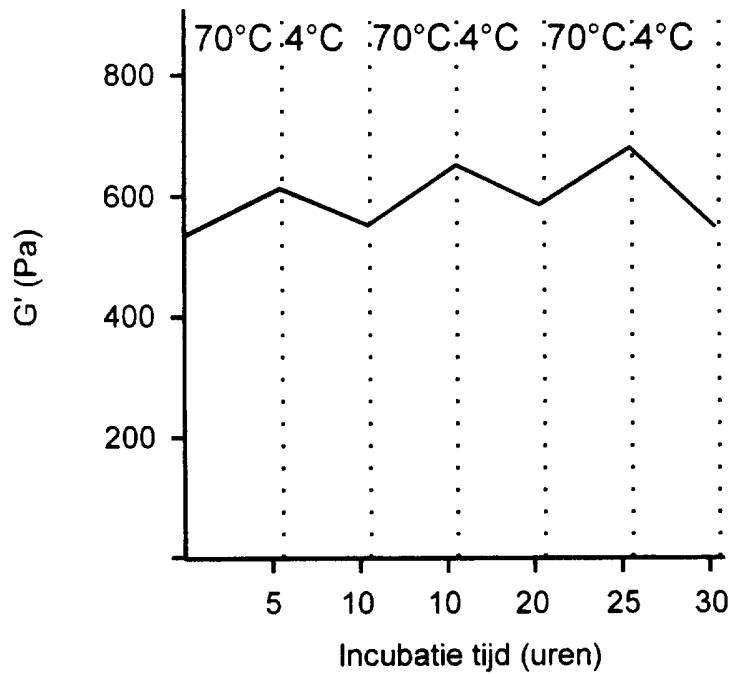
Figuur 6

1004214

A

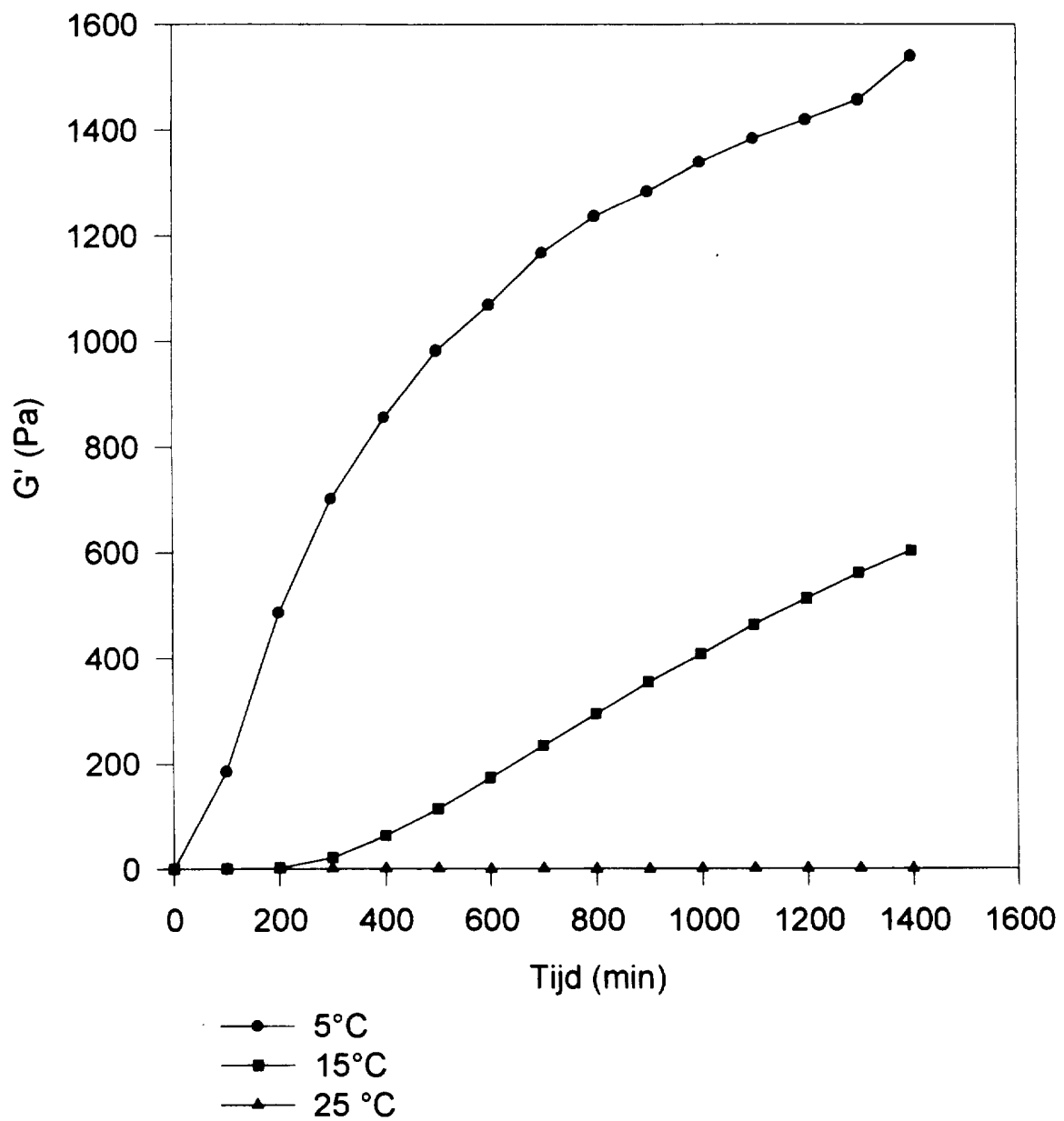


B



Figuur 7

1004214



Figuur 8

1004214

SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde Nw 9326
Nederlandse aanvraag nr. 1004214	Indieningsdatum 7 oktober 1996
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) COÖPERATIEVE VERKOOP- EN PRODUCTIEVERENIGING VAN AARDAPPELMEEL EN DERIVATEN AVEBE B.A.	
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 28338 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de internationale classificatie (IPC) Int. Cl. ⁶ : B 01 J 13/00	
II. ONDERZOCHE GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int. Cl. ⁶	B 01 J
Onderzochte andere documentatie dan de minimum documentatie voor zover dergelijke documenten in de onderzochte gebieden zijn opgenomen	
III. <input type="checkbox"/> GEEN ONDERZOEK MOGELIJK VOOR BEPAALDE CONCLUSIES (opmerkingen op aanvullingsblad)	
IV. <input type="checkbox"/> GEBREK AAN EENHEID VAN UITVINDING (opmerkingen op aanvullingsblad)	

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1004214

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 6 B01J13/00

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 B01J

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.
A	EP 0 690 170 A (AVEBE) 3 Januari 1996 zie conclusies 1-9 ---	
A	US 3 455 783 A (H.E.ALBURN ET AL) 15 Juli 1969 zie kolom 2, regel 59; conclusies 1-4 ---	
A	EP 0 355 908 A (UNILEVER NV) 28 Februari 1990 zie conclusies 1-10 -----	

Verdere documenten worden vermeld in het vervolg van vak C.

Leden van dezelfde octroofamilie 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

"&" document dat deel uitmaakt van dezelfde octroofamilie

Datum waarop het nieuwheidsonderzoek van internationaal type werd voltooid

3 Juni 1997

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

Fouquier, J-P

VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE

Informatie over leden van dezelfde octrooifamilie

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1004214

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP 690170 A	03-01-96	NL 9401090 A	01-02-96
US 3455783 A	15-07-69	GEEN	
EP 355908 A	28-02-90	AT 146504 T	15-01-97
		AU 619333 B	23-01-92
		AU 3997289 A	22-02-90
		CA 1334321 A	14-02-95
		DE 68927567 D	30-01-97
		DE 68927567 T	17-04-97
		FI 98520 B	27-03-97
		JP 2191540 A	27-07-90
		JP 2513506 B	03-07-96
		PT 91460 B	31-05-95