

(19)



Bureau voor de
Industriële Eigendom
Nederland

(11) 1012775

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1012775

(51) Int.Cl.⁷
A23C9/12

(22) Ingediend: 04.08.1999

(41) Ingeschreven:
06.02.2001

(47) Dagtekening:
06.02.2001

(45) Uitgegeven:
02.04.2001 I.E. 2001/04

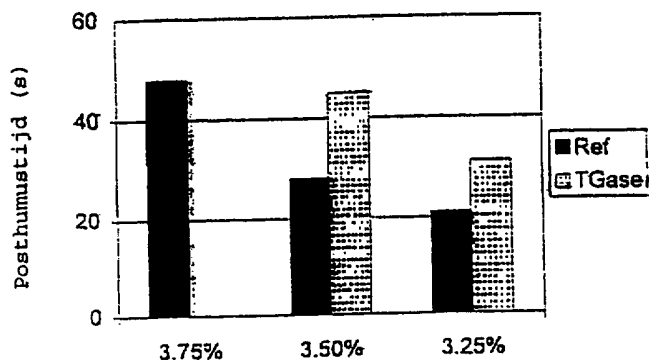
(73) Octrooihouder(s):
ZUIVELCOÖPERATIE DE ZEVEN PROVINCIE
U.A. te Zutphen.

(72) Uitvinder(s):
Margrethe Jeanette Jonkman te Deventer
Pieternella Zoom te Wageningen
Cornelis Gijsbertus de Kruif te Woudenberg
Cornelis van den Boogaard te Gorssel

(74) Gemachtigde:
Mr. Ir. A.W. Prins c.s. te 2508 DH Den Haag.

(54) Met enzym behandeld gefermenteerd product, alsmede werkwijze ter bereiding daarvan.

(57) De uitvinding betreft een werkwijze voor de bereiding van een gefermenteerd product, bijvoorbeeld een yoghurt, waarbij een fermentatiestap een verhittingsstap wordt uitgevoerd, waarbij een stap wordt uitgevoerd waarin eiwitten onder invloed van een geschikt enzym onderling worden verknoopt, gekenmerkt doordat het enzym na de verhittingsstap en bij voorkeur na de fermentatie van een eiwit bevattend uitgangproduct worden toegevoegd. Daarnaast betreft de uitvinding producten verkrijgbaar volgens deze werkwijze. Tot slot betreft de uitvinding de toepassing van een eiwit-verknopend enzym in de bereiding van een roer-yoghurt, waarbij het enzym wordt toegevoegd na de fermentatiestap, ter verkrijging van een yoghurt met een verhoogde viscositeit en/of een glad uiterlijk.



NL C 1012775

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

Titel: Met enzym behandeld gefermenteerd product, alsmede werkwijze ter bereiding daarvan.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van een gefermenteerd product, in het bijzonder een gefermenteerd zuivelproduct, waarbij een stap wordt uitgevoerd waarin melkeiwitten onder invloed van een
5 geschikt enzym onderling worden verknoopt. Bovendien betreft de uitvinding een product dat volgens deze werkwijze verkrijgbaar is. Tot slot betreft de uitvinding de toepassing van eiwit verknopend enzym ter verkrijging van een verbeterd of zelfs nieuw type gefermenteerd
10 zuivelproduct.

In de Europese octrooiaanvraag 0 610 649, ten name van Ajinomoto Co., Inc., is een werkwijze beschreven voor de bereiding van yoghurt, waarbij een uitgangsmateriaal dat melkeiwit bevat, bijvoorbeeld melk, gedurende 10-120
15 minuten wordt voorbehandeld met transglutaminase (TGase) bij een pH van 6-7 en een temperatuur van bij voorkeur 40-55°C vervolgens wordt het enzym gedeactiveerd. Hierna wordt een geschikte startercultuur toegevoegd aan het met TGase behandelde uitgangsmateriaal, waarna op overigens
20 bekende wijze yoghurt wordt bereid. Als voordeel van deze werkwijze wordt genoemd dat water- (of wei-) afscheiding wordt voorkomen, terwijl de textuur van het beoogde yoghurt-product wordt gehandhaafd.

Ook in de product-brochure
25 "transglutaminase/yoghurt" van Ajinomoto, de aanvragers van voornoemde Europese octrooiaanvraag, wordt deze werkwijze beschreven. Aangegeven wordt dat TGase ook de stevigheid en viscositeit van yoghurt kan doen toenemen. Daartoe moet TGase worden toegevoegd aan melk of een gereconstitueerde
30 melkoplossing. Vervolgens wordt gepasteuriseerd, waarbij TGase wordt geïnactiveerd, waarna een startercultuur wordt toegevoegd. Afhankelijk van het beoogde type yoghurt wordt vervolgens eerst afgevuld in houders en daarna gefermen-

teerd, dan wel wordt eerst een fermentatiestap uitgevoerd, en wordt daarna afgevuld.

Het is algemeen bekend dat voor wat betreft de bereidingswijze yoghurt in hoofdzaak kan worden ingedeeld in de typen standyoghurt en roeryoghurt. Het belangrijkste onderscheid in deze bereidingswijzen is dat bij standyoghurt de met yoghurtstarter beënte melk aansluitend aan de entstap wordt verpakt en vervolgens in de verpakking wordt verzuurd, terwijl bij roeryoghurt de verzuurde melk wordt geroerd en vervolgens verpakt.

Meer in detail wordt voor de bereiding van volle yoghurt een gestandaardiseerde melk gebruikelijk gehomogeniseerd, bijvoorbeeld bij een temperatuur van 55°C en 20 MPa, welke stap bij de bereiding van magere yoghurt achterwege kan blijven, vervolgens gepasteuriseerd (bijvoorbeeld 5 minuten bij 85°C), gekoeld tot ongeveer 45°C (standyoghurt)/30-32°C (roeryoghurt), en geënt met een geschikt zuursel. Vervolgens wordt ter bereiding van een standyoghurt de beënte samenstelling verpakt, gedurende enige tijd bebroed, en aansluitend gekoeld. Ter bereiding van een roeryoghurt wordt de beënte samenstelling eerst bebroed, vervolgens geroerd, en daarna gekoeld tot een temperatuur van 6°C en verpakt dan wel eerst verpakt en dan gekoeld.

In de genoemde product-brochure van Ajinomoto wordt gesteld dat voor roeryoghurt de volgende voordelen aan het toepassen van TGase worden toegeschreven: een verhoogde viscositeit, een geoptimaliseerde verdikking en een verbeterde rheologische stabiliteit; er kan worden volstaan met minder stabiliseermiddel. Bovendien kan een yoghurt met een lager vetgehalte of een lager vetvrije-droge-stofgehalte worden bereid met de body en structuur van een vettere yoghurt of een yoghurt met een hoger vetvrije-droge-stofgehalte. Voor stand-type yoghurt wordt aangegeven dat een grotere stevigheid wordt verkregen naast een

verminderde serumafscheiding en een textuurverbetering van minder vette yoghurt.

Yoghurt is een visco-elastisch materiaal; het is een gel. Door het roeren wordt het gel gebroken, waarna het visceuze karakter overheerst. Roeryoghurt is daarmee een vloeistof geworden waarvan de viscositeit sterk afneemt met toenemend snelheidsgradiënt. Het is een oneigenlijk thixotroop product waarvan de viscositeit na de roerstap nog maar weinig toeneemt. Een gel wordt niet meer gevormd.

Conventionele stand- en roeryoghurt verschillen aanzienlijk in consistentie. Standyoghurt is een gel; men bepaalt vaak de stevigheid ervan door er een kogel van een bepaald gewicht en een bepaalde diameter gedurende bepaalde tijd in te laten zakken. De reciproke van de indringdiepte is een maat voor de stevigheid. Deze stevigheidswaarde hangt niet alleen af van de elasticiteitsmodulus; de viscositeit draagt ook bij. Een nadeel van standyoghurt is dat het vaak serumafscheiding vertoont; dit probleem doet zich reeds direct na bereiding voor, doch zeker wanneer het geroerd of uitgeschept is. Roeryoghurt behoort gietbaar en tamelijk visceus te zijn. Men bepaalt vaak de (schijnbare) viscositeit nadat er op een gestandaardiseerde wijze onder goed gedefinieerde proefomstandigheden in is geroerd. Een probleem dat zich bij roeryoghurt manifesteert wordt aangeduid met de term "uitzakking". Uitzakking wordt onder meer veroorzaakt door een relatief lage viscositeit. Daarnaast is doorzuring een probleem. Deze problemen zijn inherent aan het voor de bereiding toegepaste proces.

In het Bulletin of the IDF 332, pagina's 47-53 beschrijven Lorenzen en Schlimme in een artikel getiteld "Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying" het effect van verknoping van caseïnemoleculen op de textuur van yoghurt. Ook in dit artikel - net als overigens in het artikel "Pilot studies on the effect of enzymatic crosslinking in dairying" van dezelfde auteurs in

Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 49(3)
221-227 (1997) - wordt gestandaardiseerde melk eerst
gedurende 2 uur bij 37°C met het TGase behandeld, waarna
het enzym wordt gedeactiveerd in een verhittingsstap.

- 5 Vervolgens wordt de behandelde samenstelling verzuurd.
Gevonden werd dat bij de beschreven werkwijze, die typerend
kan worden aangeduid als werkwijze voor de bereiding van
een standyoghurt, de gelsterkte van de verkregen yoghurt
groter was en synerese minder optrad.

- 10 De onderhavige uitvinders hebben de werkwijzen
volgens genoemde Europese octrooiaanvraag 0 610 649,
genoemde product-brochure van Ajinomoto en de publicaties
van Lorenzen en Schlimme intensief bestudeerd en daarbij
gefounden dat de gepretendeerde voordelen alleen geldend
15 kunnen worden gemaakt wanneer het yoghurt-product een
standyoghurt is.

- Meer in detail is gebleken dat wanneer een
roeryoghurt wordt bereid onder toepassing van de bekende
werkwijze volgens genoemde Europese octrooiaanvraag en
20 beide artikelen na de fermentatiestap een product wordt
verkregen met weliswaar een steviger yoghurtgel, doch dat
na de roerstep de viscositeit van de yoghurt niet of
nauwelijks was toegenomen in vergelijking met een yoghurt
bereid uit een niet met TGase behandelde, doch overigens
25 identieke melk, en/of dat gelbrokjes aanwezig waren en het
product in het algemeen een ruwer uiterlijk had dan de
roeryoghurt bereid uit de onbehandelde melk. De gelbrokjes
konden worden gebroken door de yoghurt zeer krachtig te
roeren dan wel door een spleet te persen. Dit leidt evenwel
30 tot een nadelig effect op de viscositeit, met name wanneer
een magere yoghurt werd beoogd.

- Volgens de onderhavige uitvinding is nu
verrassenderwijs gevonden dat wanneer een enzym dat
eiwitten onderling laat verknopen na een gebruikelijke
35 verhittingsstap, zoals een thermisatie, pasteurisatie of
sterilisatie, en bij voorkeur na fermentatie, van een

eiwit-bevattend product aan dat product wordt toegevoegd, er een gefermenteerd product wordt verkregen met een consistentie die wezenlijk anders is dan wanneer het enzym voor verhittingsstap en de fermentatiestap wordt toegepast. Niet alleen is het verrassend dat de consistentie wezenlijk verschilt, maar ook dat het eiwit verknopende enzym volgens de uitvinding wordt toegepast onder omstandigheden die voor het betreffende enzym aanzienlijk minder ideaal zijn dan de omstandigheden zoals deze in de bekende werkwijze zijn gekozen. Met name is de pH door de fermentatiestap aanzienlijk gedaald.

Meer in het bijzonder betreft de uitvinding een werkwijze voor de bereiding van een gefermenteerd product, waarbij voor de fermentatiestap een verhittingsstap wordt uitgevoerd, en waarbij een stap wordt uitgevoerd waarin eiwitten onder invloed van een geschikt enzym onderling worden verknoopt, gekenmerkt doordat het enzym na de verhitting van een eiwit bevattend uitgangproduct wordt toegevoegd. Bij voorkeur wordt het enzym na fermentatie van het eiwit bevattend uitgangproduct toegevoegd, hoewel ook toevoeging van het enzym tijdens de fermentatiestap een reële optie is. Zonder aan enige wetenschappelijke theorie te willen worden gebonden of de uitvinding te willen beperken, wordt aangenomen dat na een fermentatie intermoleculaire eiwit-eiwitbindingen worden gevormd. Door deze intermoleculaire bindingen wijzigen de functionele eigenschappen van de eiwitten en daarmee de product-eigenschappen van de producten die deze eiwitten omvatten.

Voor eiwitverknoping komt in principe een relatief groot aantal soorten enzymen in aanmerking, zoals proteïne-disulfide-isomerase, sulphydryloxidasen, polyfenoloxidasen, lysisloxidasen, peroxidasen, TGases, lipoxxygenases en glucose-oxidasen. De genoemde enzymen katalyseren verschillende reacties, en afhankelijk van de eiwitten aanwezig in de te fermenteren uitgangproducten en de beoogde toepassingen kan een deskundige geschikte enzymen

kiezen. Zeer geschikt zijn TGase, peroxidase en glucose-oxidase toe te passen, onder meer vanwege de beschikbaarheid.

In een voorkeursuitvoeringsvorm wordt als eiwit-
 5 verknopend enzym TGase toegepast. Er zijn twee typen TGase bekend: dierlijk en microbieel. In tegenstelling tot dierlijk TGase is de activiteit van microbieel geproduceerde TGase onafhankelijk van de aanwezigheid van calciumionen. Het enzym TGase katalyseert bepaalde verknopingsreacties
 10 tussen eiwitten. Meer in het bijzonder wordt een glutaminegroep van een eiwitmolecuul - via een covalente binding - verbonden met een lysinegroep van een eiwitmolecuul, waardoor intermoleculaire bindingen kunnen ontstaan. In de producten waarin de onderhavige uitvinding kan worden
 15 toegepast, is doorgaans een grote fractie caseïne, betrokken op het totale eiwit, aanwezig; zo bestaat bijvoorbeeld zo'n 80 gew.% van alle eiwit in melk uit caseïne. Caseïnes vormen een geschikt substraat voor TGase. Voor een verdere beschrijving van genoemd enzym zij
 20 verwezen naar de bovengenoemde artikelen van Lorenzen en Schlimme, en EP-A-0 610 649, alsmede de in deze publicaties genoemde verwijzingen. TGase is commercieel verkrijgbaar, onder andere bij Ajinomoto Co, Inc., Tokyo, Japan.

Als uitgangspunt wordt bij voorkeur een product
 25 toegepast waarin melkeiwitten aanwezig zijn, en wordt bij voorkeur een gefermenteerd zuivelproduct bereid. Meer in het bijzonder is de uitvinding gericht op het verkrijgen van zuivelproducten zoals kwark, verse kaas, karnemelk, melkproducten die verkregen worden onder toepassing van
 30 *Bifido* en *L. acidophilus* resp. *L. casei* stammen, Ymer en Dickmilch doch bij hoogste voorkeur yoghurt, zowel van het roer- als stand-type; bij voorkeur yoghurt en karnemelk.

Wanneer na de fermentatiestap en na het toevoegen van het enzym een roerstap wordt uitgevoerd, kan niet
 35 alleen een roeryoghurt worden verkregen, maar verrassenderwijs ook een standyoghurt. Dit laatste feit biedt mogelijk-

heden om volledige nieuwe typen standyoghurts te bereiden, waarin bijvoorbeeld vruchtenmassa of andere stukjes levensmiddel kunnen worden ingeroerd. Bovendien kan op deze wijze een standyoghurt worden verkregen zonder dat de

5 verpakte yoghurt aan een behandeling in een broedkamer hoeft te worden onderworpen, hetgeen inhoudt dat de bereidingswerkwijze voor standyoghurt aanzienlijk kan worden vereenvoudigd. De onderhavige uitvinding strekt zich derhalve ook uit tot een standyoghurt, verkrijgbaar volgens

10 de werkwijze volgens de uitvinding waarbij na de fermentatiestap een roerstap wordt toegepast. Op overeenkomstige wijzen kunnen producten worden gemaakt op basis van karnemelk (cultured milk/fermented milk).

Hoewel de onderstaande beschrijving met name

15 voorbeelden geeft die betrekking hebben op yoghurt, dient dit niet beperkend te worden opgevat. Ook andere gefermenteerde melkproducten kunnen volgens de onderhavige uitvinding worden behandeld.

Zoals hierboven reeds is aangegeven ligt een

20 belangrijk aspect van de onderhavige uitvinding in het toevoegen van het eiwit verknopende enzym tijdens of na de fermentatiestap en bij voorkeur tijdens of na een daarop volgende roerstap. De onderhavige uitvinders hebben bovendien gevonden dat het moment, waarop het eiwit

25 verknopende enzym na de roerstap wordt toegevoegd, terwijl het gefermenteerde product van de fermentatietemperatuur die doorgaans tussen 25 en 50°C, en gebruikelijk tussen 30 en 45°C ligt, afkoelt, van invloed is op het eindresultaat. Meer in het bijzonder, kan, wanneer het enzym snel na het

30 doorroeren, bijvoorbeeld wanneer het gefermenteerde product nog niet verder gekoeld is dan 25-30°C, wordt toegevoegd, een product worden verkregen met een enigszins verhoogde viscositeit en een gladde consistentie.

Meer in detail, levert, zoals uit het onderstaande

35 voorbeeld 2 blijkt, een incubatie bij 40°C een roeryoghurt met een geringe verhoging van de viscositeit op; gelering

vindt nog niet plaats. De verkregen roeryoghurt is - in vergelijking met de roeryoghurt als verkregen volgens de product-brochure van Ajinomoto - glad.

Wanneer de tijdsspanne tussen toevoegen van het
5 eiwit verknopend enzym en de roerstap groter wordt en het gefermenteerde product inmiddels is afgekoeld tot een temperatuur van lager dan 18°C, bij voorkeur bij een temperatuur tussen 2 en 15°C, het liefst tussen 5 en 10°C, kan bovendien gelvorming optreden, welke gelvorming
10 afhankelijk van de aard en de hoeveelheid van het toegepaste enzym bij de bereiding van yoghurt zelfs tot een geroerde standyoghurt kan leiden. Door toevoeging van transglutaminase bij een temperatuur lager dan 18°C krijgt het gefermenteerde product en met name het gefermenteerde
15 zuivelproduct, bij voorkeur de yoghurt een hogere viscositeit gekoppeld aan een glad uiterlijk of wordt zelfs een gel gevormd. Wanneer een roeryoghurt wordt beoogd, doch gelvorming lijkt op te treden, kan eenvoudig een tweede maal worden geroerd, waarbij alle voordelen volgens de
20 uitvinding worden behouden. Deze voordelen worden in het geval van de toepassing van TGase verkregen bij omstandigheden (pH lager dan 5 en een temperatuur onder 15°C) die volgens de stand der techniek, zoals bijvoorbeeld bovengenoemde product-brochure, verre van ideaal zijn voor
25 de werking van TGase.

Overigens maakt deze uitvoeringsvorm het eveneens mogelijk een yoghurt met normale viscositeit en consistentie te bereiden, althans met een viscositeit en een textuur of consistentie die doorgaans gekoppeld is aan
30 een yoghurtproduct bereid uit een melk met een hoger eiwitgehalte. Met andere woorden maakt deze uitvoeringsvorm het mogelijk een yoghurt te bereiden met een lager eiwitgehalte. Dergelijke voordelen kunnen ook met anderen gefermenteerde melkproducten, zoals karnemelk, worden
35 verkregen. Het mogelijk kunnen toepassen van een uitgangsmateriaal met een lager eiwitgehalte heeft met name

economische voordelen omdat aldus relatief duur eiwit voor andere toepassingen kan worden aangewend.

Zoals gesteld kan volgens de werkwijze volgens de uitvinding een roeryoghurt worden verkregen die een in
 5 hoofdzak hogere viscositeit heeft dan een dergelijk product dat op de wijze beschreven in de publicaties van Lorenzen en Schlimme, EP-A-0 610 649 of de product-brochure van Ajinomoto uit eenzelfde uitgangspunt is bereid. Daarnaast heeft het product met verhoogde viscositeit ook
 10 nog een gladde consistentie. Derhalve heeft de uitvinding eveneens betrekking op een product verkrijgbaar volgens de werkwijze volgens de uitvinding.

Tot slot betreft de uitvinding de toepassing van een eiwit verknopend enzym in de bereiding van een roeryoghurt,
 15 waarbij het enzym wordt toegevoegd tijdens of na de fermentatiestap, ter verkrijging van een yoghurt met een glad uiterlijk, eventueel gekoppeld aan een hogere viscositeit.

De activiteitseenheden voor de toe te passen enzymen
 20 worden op in de stand der techniek bekende methoden bepaald. Zo wordt voor het bepalen van de activiteits-eenheden TGase verwezen naar de hierboven besproken Europese octrooiaanvraag 0 610 649.

Thans zal de onderhavige uitvinding verder worden
 25 geïllustreerd aan de hand van de volgende, niet-beperkende voorbeelden.

Voorbeeld 1 (vergelijking)

Voor de bereiding van een magere yoghurt werd een
 30 yoghurtmelk gemaakt uit een charge ondermelkpoeder (totaal eiwitgehalte (= totaal N x 6,38) 39%; niet-caseïne-eiwit (N x 6,38) 8,54%) en gestandaardiseerd op een eiwitgehalte van 3,75%. Vervolgens werd de melk gepasteuriseerd gedurende 5 minuten bij 85°C. De yoghurtmelk werd geënt met een mengsel
 35 van RR- en IST-zuursel (1:1; verkrijgbaar bij CSK Food Enrichment, Leeuwarden) met een dosering van

0,002% zuurselconcentraat (v/v). Yoghurtbereiding vond plaats bij een temperatuur van 32°C. Het eindpunt van de verzuring van de yoghurt werd gelegd op het moment dat de pH tot $4,30 \pm 0,05$ was gedaald. Dit tijdstip lag rond de 16 uur +/- 30 min. Het bereiden van de referentiejoghurt is in viervoud uitgevoerd. De verzuring is in deze vier gevallen gestopt na 15 uur en 40 minuten. De yoghurt werd vervolgens geroerd.

Voor varianten waar bij de bereiding van roeryoghurt transglutaminase is gebruikt, werden aan de yoghurtmelk 5 of 50 units transglutaminase per gram eiwit toegevoegd. Het enzym werd als geconcentreerde oplossing toegevoegd aan melk, en de melk met enzym werd gedurende 60 minuten geïncubeerd bij 55°C. Vervolgens werd de melk op dezelfde manier gepasteuriseerd als hierboven staat beschreven en werd op dezelfde manier yoghurt bereid.

De breukspanning na verzuring van het yoghurtgel werd bepaald (Marle, M. van, (1998). Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts. Proefschrift TU Twente). Als maat voor de viscositeit van roeryoghurt werd de doorstroomtijd van yoghurt in een Posthumustrechter bepaald bij 20°C (Galesloot, T.E., (1958). Onderzoekingen over de consistentie van yoghurt / Investigations concerning the consistency of yoghurt; Netherlands Milk and Dairy Journal, 12, 130-161).

Evenals door Lorenzen en Schlimme (als bovengenoemd) beschreven is, werd een steviger yoghurtgel verkregen na toevoegen van 5 units transglutaminase per gram eiwit aan de yoghurtmelk. De breukspanning voor yoghurt met 5 units transglutaminase per gram eiwit was ongeveer twee keer zo hoog als van de referentie yoghurt. Na roeren was de viscositeit, gemeten als uitstroomtijd van de Posthumustrechter, echter zowel van de yoghurt zonder toevoeging van transglutaminase als van de yoghurt waaraan 5 units transglutaminase per gram eiwit was toegevoegd, ongeveer

gelijk; 34 s. De uitstroomtijden van yoghurt met 50 units transglutaminase per gram eiwit konden niet bepaald worden, omdat deze producten zo brokkelig waren dat ze geen samenhangend geheel meer vormden.

- 5 Uit bovenstaande werd geconcludeerd dat toevoegen van transglutaminase aan melk niet leidt tot een gladde roeryoghurt met een verhoogde viscositeit.

Voorbeeld 2 (uitvinding)

- 10 Waar in voorbeeld 1 TGase voor de verhittingsstap en fermentatie werd toegevoegd, werd in dit voorbeeld de TGase na de fermentatie toegevoegd.

- Aan magere roeryoghurt (Coberco Zuivel) werden diverse concentraties transglutaminase toegevoegd. Het
15 enzym werd toegevoegd als een oplossing. De yoghurt werd vervolgens gedurende 2 uur geïncubeerd bij 40°C.

 Als maat voor de viscositeit werd de doorstroomtijd van yoghurt in een Posthumustrechter bepaald bij 2°C.

- In tabel 1 is de doorstroomtijd van roeryoghurt
20 weergegeven na incubatie met transglutaminase.

- Tabel 1: Viscositeit (in seconden) van roeryoghurt na incubatie met respectievelijk 2 U, 5 U en 50 U TGase per gram eiwit gedurende 2 uur bij 40°C, gemeten met Posthumustrechter, temperatuur van de
25 monsters = 2°C.

Monster	Doorstroomtijd (s)
Referentie	49
+2 U/g	52
+5 U/g	57
+50 U/g	51

- De viscositeit van de monsters nam in geringe mate
30 toe. Bij incubatie met 50 units transglutaminase per gram eiwit nam de viscositeit af ten opzichte van de overige

monsters. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt doordat het enzym als oplossing is toegevoegd, waardoor de yoghurt verdund is.

5 Voorbeeld 3 (uitvinding)

Aan magere roeryoghurt (Coberco Zuivel) werden diverse concentraties transglutaminase toegevoegd. Het enzym werd toegevoegd als een oplossing. In het bijzonder bevat het gebruikte transglutaminasepreparaat ook lactose
10 (90%) en maltodextrine (9%). Het verschil in toegevoegd lactose en maltodextrine met het transglutaminase preparaat werd gecompenseerd door extra lactose en maltodextrine toe te voegen. De totale concentratie lactose en maltodextrine was derhalve in alle monsters steeds gelijk.

15 De yoghurt werd vervolgens geïncubeerd bij 4 en 10°C.

Als maat voor de viscositeit werd de doorstroomtijd van yoghurt in een Posthumustrechter bepaald bij 10°C.

Bij incubatie bij lage temperaturen werd geen
20 verschil waargenomen tussen de viscositeit van monsters na incubatie bij 4 of 10°C. In de volgende experimenten werd daarom gekozen voor een incubatietemperatuur van 10°C.

De resultaten zijn in tabel 2 inzichtelijk gemaakt.

In tabel 2 is de doorstroomtijd van roeryoghurt bij
25 10°C na incubatie met transglutaminase weergegeven. Na incubatie met 20 units transglutaminase per gram eiwit was de viscositeit hoger dan van de referentie. In de roeryoghurt met 50 unit TGase per gram eiwit werd tussen 5 en 11 uur incubatie een gel gevormd, dat na 1 dag zo
30 stevig was dat het niet brak bij kantelen. Dit gel moest eerst doorgeroerd worden voordat het door de Posthumustrechter geschonken kon worden.

Tabel 2: Doorstroomtijd van roeryoghurt bij 10°C na 1 dag.
* gel was gevormd, monster is 8 maal doorgeroerd voordat doorstroomtijd bepaald is.

Transglutaminase (U/g eiwit)	Posthumustijd (s)
0	22
5	21
10	23
20	28
50*	39

5

Na doorroeren van het yoghurtmonster met 50 U TGase per gram eiwit werd een gladde yoghurt verkregen die dikker was dan de referentie.

10 Voorbeeld 4 (uitvinding)

In dit voorbeeld is onderzocht of de viscositeit van de roeryoghurt toenam door de roeryoghurt langer te incuberen met transglutaminase. In tabel 3 is de viscositeit uitgezet van yoghurtmonsters, zoals die bereid zijn in voorbeeld 3 na 1 en na 4 dagen bewaren bij 10°C.

15

Tabel 3: Doorstroomtijd van roeryoghurt bij 10°C na 1 en 4 dagen. * gel was gevormd, monster is 8 maal doorgeroerd voordat doorstroomtijd bepaald is.

20

Transglutaminase (U/g eiwit)	Posthumustijd (s) dag 1	Posthumustijd (s) dag 4
0	22	21
5	21	25
10	23	31*
20	28	34*
50	39*	43*

Uit tabel 3 blijkt dat in de yoghurtmonsters die 4 dagen bij 10°C geïncubeerd waren met 10, 20 en 50 units transglutaminase per gram eiwit een gel was gevormd. De viscositeit na doorroeren van de yoghurtmonsters die 4 dagen geïncubeerd waren met transglutaminase was hoger dan die 1 dag waren geïncubeerd.

Voorbeeld 5 (uitvinding)

In tabel 4 zijn de resultaten van de sensorische test weergegeven. Bij vergelijking van magere yoghurt met en zonder TGase kreeg de yoghurt met 10 U TGase per gram eiwit de hoogste waardering; deze gaf het prettigste mondgevoel. De magere yoghurt met 10 U TGase smaakte minder romig dan volle yoghurt.

Van de yoghurtmonsters is de zuurtegraad bepaald, dit is een maat voor de zure smaak van een product. Naarmate de zuurtegraad hoger is smaakt het product zuurder. Hoewel de monsters ongeveer dezelfde zuurtegraad hebben, werd het monster met 10 U toch als minder zuur beoordeeld dan de magere yoghurt zonder TGase.

Tabel 4: Resultaten sensorische beoordeling

Behoordeling monsters		
Beoordeeld product en commentaar	Zuurtegraad	pH
<u>Referentie - magere yoghurt Coberco</u>	122°N	4,1
<u>A magere yoghurt Coberco-5U/gp TG</u> -> het zuurst	127°N	4,2
<u>B magere yoghurt Coberco-10U/gp TG</u> -> heel klein beetje romig -> prettig mondgevoel -> minder zuur dan A en Ref.	126°N	4,2

Voorbeeld 6

5 In dit voorbeeld werden de viscositeiten vergeleken van roeryoghurt met 3,75% eiwit (referentiejoghurt), een roeryoghurt met 3,50% eiwit en een roeryoghurt met 3,25% eiwit. Deze yoghurtmonsters met verlaagd eiwitgehalte werden ook behandeld met TGase.

10 In figuur 1 zijn de viscositeiten weergegeven van yoghurtmonsters met en zonder TGase, waarbij de monsters met TGase doorgeroerd zijn voor de meting en de monsters zonder TGase niet. Na incubatie gedurende 7 dagen bij 10°C was in alle drie de typen yoghurt een gel gevormd. Na

15 doorroeren van deze monsters waren de viscositeiten hoger dan van de bijbehorende referentie monsters. De viscositeit van het monster met 3,50% eiwit is na incubatie met TGase ongeveer even hoog als die van het yoghurtmonster met 3,75% eiwit zonder TGase. Hieruit volgt dat het mogelijk is om

20 door toepassing van TGase een roeryoghurt te maken met verlaagd eiwitgehalte.

Voorbeeld 7

In dit voorbeeld werd onderzocht of de viscositeit van karnemelk ook toenam door incubatie met transglutaminase.

- 5 Aan karnemelk (Coberco Zuivel) werden bij 7°C twee concentraties (12 en 60 u/g eiwit) transglutaminase toegevoegd. Na 4 dagen bij 7°C is bij beide varianten een gel gevormd. Het gel van de variant met 60 U TGase per gram eiwit is steviger dan het gel van de variant met 12 U TGase
- 10 per gram eiwit. Na doorroeren met een lepel wordt de karnemelk weer dun.

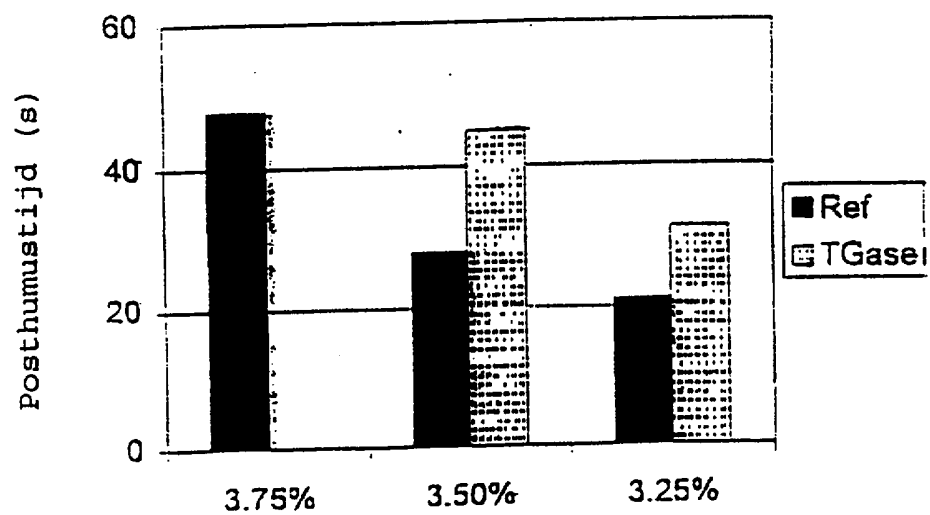
Uit dit voorbeeld blijkt dat toevoegen van transglutaminase aan karnemelk leidt tot vorming van een gel bij 7°C.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor de bereiding van een gefermenteerd product, waarbij voor de fermentatiestap een verhittingsstap wordt uitgevoerd, en waarbij een stap wordt uitgevoerd waarin eiwitten onder invloed van een geschikt enzym
5 onderling worden verknoopt, met het kenmerk, dat het enzym tijdens of na de verhitting van een eiwit bevattend uitgangproduct wordt toegevoegd.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarbij het enzym na de fermentatie van het eiwit bevattend uitgangproduct
10 wordt toegevoegd.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarbij als uitgangproduct een product wordt toegepast waarin melkeiwitten aanwezig zijn.
4. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies,
15 waarbij na de fermentatiestap en na het toevoegen van het enzym een roerstap wordt uitgevoerd.
5. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, waarbij een yoghurt en yoghurt product, een karnemelk of karnemelk product wordt bereid.
- 20 6. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, waarbij als enzym transglutaminase wordt toegepast.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, waarbij voor de toevoeging van het enzym het gefermenteerde product wordt gekoeld tot een temperatuur beneden 18°C, bij voorkeur
25 tussen 2 en 15°C, het liefst tussen 5 en 10°C.
8. Product verkrijgbaar volgens de werkwijze volgens één der voorgaande conclusies.
9. Standyoghurt, verkrijgbaar volgens de werkwijze volgens conclusie 4.

10. Toepassing van een eiwit-verknopend enzym in de bereiding van een roeryoghurt, waarbij het enzym wordt toegevoegd na de fermentatiestap, ter verkrijging van een yoghurt met een verhoogde viscositeit en/of een glad
5 uiterlijk.

Figuur 1



SAMENWERKINGSVERDRAG (PCT)
RAPPORT BETREFFENDE
NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN INTERNATIONAAL TYPE

IDENTIFIKATIE VAN DE NATIONALE AANVRAGE	Kenmerk van de aanvrager of van de gemachtigde P10471NL00
Nederlandse aanvrage nr. 1012775	Indieningsdatum 4 augustus 1999
	Ingeroepen voorrangsdatum
Aanvrager (Naam) Verenigde Coöperatieve Melkindustrie Coberco 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 33770 NL
I. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP (bij toepassing van verschillende classificaties, alle classificatiesymbolen opgeven)	
Volgens de Internationale classificatie (IPC) Int.Kl.7: A 23 C 9/127	
II. ONDERZOChte GEBIEDEN VAN DE TECHNIEK	
Onderzochte minimum documentatie	
Classificatiesysteem	Classificatiesymbolen
Int.Cl.7:	A 23 C
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)	

**VERSLAG VAN HET NIEUWHEIDSONDERZOEK VAN
INTERNATIONAAL TYPE**

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek

NL 1012775

A. CLASSIFICATIE VAN HET ONDERWERP
IPC 7 A23C9/127

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 7 A23C

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.
X	EP 0 521 166 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD (JP);) 7 Januari 1993 (1993-01-07)	1,5,8,9
A	bladzijde 5, regel 37 - regel 42; conclusie 6; voorbeeld 3	2-4,6,7, 10
X	EP 0 642 740 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 15 Maart 1995 (1995-03-15)	1,5,8,9
A	bladzijde 3, regel 1 - regel 20, conclusie 2; voorbeeld 1	2,3,7,10
A	EP 0 610 649 A (AJINOMOTO KK) 17 Augustus 1994 (1994-08-17) in de aanvraag genoemd voorbeeld 1	1-10
A	WO 93 19610 A (NOVONORDISK AS) 14 Oktober 1993 (1993-10-14) voorbeeld 2	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

29 Maart 2000

Verzenddatum van het rapport van het nieuwheidsonderzoek van Internationaal type

Naam en adres van de instantie

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

De bevoegde ambtenaar

Saunders, T

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

Nummer van het verzoek om een nieuwheidsonderzoek
NL 1012775

In het rapport genoemd octroolgeschrift		Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
EP 0521166	A	07-01-1993	DE 69228845 D	12-05-1999
			DE 69228845 T	07-10-1999
			WO 9213064 A	06-08-1992
EP 0642740	A	15-03-1995	JP 6276933 A	04-10-1994
			WO 9422317 A	13-10-1994
EP 0610649	A	17-08-1994	JP 6197688 A	19-07-1994
			DE 69400761 D	28-11-1996
			DE 69400761 T	22-05-1997
WO 9319610	A	14-10-1993	AT 182746 T	15-08-1999
			AU 660796 B	06-07-1995
			AU 3948793 A	08-11-1993
			CA 2132301 A	14-10-1993
			DE 69325918 D	09-09-1999
			DE 69325918 T	09-03-2000
			EP 0671885 A	20-09-1995
			JP 7505287 T	15-06-1995
			NZ 251678 A	28-08-1995