

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Juli 2003 (03.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/054024 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C08B 30/14, A23L 1/0522, A23K 1/00, C09J 103/02, C09D 103/02, C08L 3/02
- (74) Anwälte: LEDERER, Franz usw.; LEDERER & KELLER, Prinzregentenstrasse 16, 80538 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14600
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
19. Dezember 2002 (19.12.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Angaben zur Priorität:  
101 63 541.9 21. Dezember 2001 (21.12.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BAYER CROPSCIENCE GMBH [DE/DE]; Brün-  
ingstrasse 50, 65929 Frankfurt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KLINGLER, Rudolf [DE/DE]; Am Kesselpfuhl 65a, 13437 Berlin (DE).  
BUSCH, Karl-Georg [DE/DE]; Uhlenhorst 18, 14532 Kleinmachnow (DE).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PREGELATINIZED STARCHES AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: QUELLSTÄRKEN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a pregelatinized starch that has good gelling properties, which comprises the following steps: a) producing a suspension on the basis of starch and water, b) applying the suspension produced in a) to a hot roller of a roller drier, and c) isolating the pregelatinized starch obtained in b). The starch used according to the invention is potato starch with an amylose content of at least 30 % by weight. The invention also relates to the novel pregelatinized starch so produced and to its use for producing firm gels, food items, especially instant puddings, feedstuff, adhesives and paints. The invention further relates to compositions that contain such a pregelatinized starch, especially a dry mixture for producing instant puddings.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Quellstärke mit guten Gelbildungseigenschaften, worin a) eine Suspension aus Stärke und Wasser hergestellt wird, b) die in a) hergestellte Suspension auf eine heiße Walze eines Walzentrockners aufgebracht wird, und c) die durch Verfahrensschritt b) erhaltene Quellstärke isoliert wird. Erfindungsgemäß wird eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 30 Gew.-% eingesetzt. Die Erfindung umfasst auch die neue, so hergestellte Quellstärke und deren Verwendung zur Herstellung von schnittfesten Gelen, Lebensmitteln, insbesondere Instant-Puddings, Futtermitteln, Klebstoffen und Farben. Die Erfindung betrifft auch Zusammensetzungen, die eine solche Quellstärke enthalten, insbesondere eine Trockenmischung zur Herstellung von Instant-Puddings.

WO 03/054024 A1

---

### Quellstärken und Verfahren zu deren Herstellung

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Quellstärke sowie die durch dieses Verfahren erhältliche Quellstärke. Sie betrifft ferner Zusammensetzungen enthaltend diese Quellstärke, insbesondere Trockenmischungen zur Herstellung von Instant-Puddings. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung der neuen Quellstärken zur Herstellung von Lebensmitteln, insbesondere Instant-Puddings, Futtermitteln, Klebstoffen und Farben.

Quellstärken sind physikalisch modifizierte Stärken, die vorwiegend durch naßthermischen Aufschluß hergestellt werden. Im Unterschied zu nativer Stärke bilden sie mit kaltem Wasser Dispersionen bzw. Pasten oder Gele, je nach eingesetzter Konzentration der Quellstärke und in Abhängigkeit von der zur Herstellung der Quellstärke verwendeten Stärkeart. Aufgrund dieser Eigenschaften ergeben sich für Quellstärken eine Reihe von Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelindustrie und außerdem in vielen technischen Bereichen. Die Verwendung von Quellstärke, die auch als kaltquellende Stärke bezeichnet wird, anstelle von nativer Stärke hat in verschiedenen Fällen den Vorteil, daß Produktionsverfahren vereinfacht und verkürzt werden können.

Grundsätzlich ist die Herstellung von kaltquellender Stärke (Quellstärke) mit verschiedenen Verfahren möglich, beispielsweise durch naßthermische Behandlung mit einem Walzentrockner, mechanisch-thermische Behandlung mit dem Extruder oder ausschließlich mechanische mit der Schwingmühle. Gemeinsam ist allen Verfahren, daß durch nicht näher bekannte Energieübertragungsprozesse die gewachsene Stärkekorntstruktur bzw. die parakristalline Molekülorganisation aufgelöst und die Stärke in eine amorphe Substanz überführt wird. Da bei den genannten Verfahren die Arbeitsvariablen sich qualitativ und quantitativ voneinander unterscheiden, resultieren daraus Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften.

Die industrielle Quellstärkeherstellung erfolgt hauptsächlich mit dem Walzentrockner. In der Regel wird hierbei eine ca. 35%ige Stärke-Wasser-Suspension auf die Oberfläche einer beheizten Walze des Walzentrockners aufgetragen. Auf der Walzenoberfläche wird die Stärke sowohl verkleistert als auch dehydratisiert.

Um Stärke Kaltquelleigenschaften zu verleihen, muß die Kornstruktur bzw. parakristalline Struktur der Stärke während der Erhitzung auf dem Walzentrockner (beispielsweise für <1 Minute bei ca. 100°C) aufgelöst werden. Dadurch wird ein Intermediärzustand zwischen dem eines Feststoffs und einer vollständig löslichen Substanz erreicht.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß anstelle der Stärke-Wasser-Suspension ein vorgekochter Stärkekleister auf die Walze zur Trocknung gegeben wird.

Ferner sind verschiedene Varianten des Walzentrocknungsverfahrens beschrieben, in denen die Vorverkleisterung in Gegenwart von Zusätzen wie Salzen, Säuren, Lipiden etc. vorgenommen wird und/oder in denen chemisch modifizierte Stärken als Ausgangsmaterial eingesetzt werden.

Für die Herstellung beispielsweise von Instant-Desserts und -Puddings werden Quellstärken benötigt, die nach dem Einrühren in kalte Flüssigkeit, wie z.B. Wasser oder Milch, innerhalb kurzer Zeit schnittfeste Gele, wie beispielsweise im Falle eines Kochpuddings, bilden. Diese Anforderungen erfüllen die kommerziellen Quellstärken aus Weizen-, Kartoffel- oder Maisstärke nicht. Zur Erzielung der vorgenannten Eigenschaften sind bei den bisher kommerziell verfügbaren Quellstärken Zusätze zur Quellstärke wie Gelatine, Alginat, Carrageenan (Carrageen) und/oder anorganische Salze notwendig.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Quellstärken zur Verfügung zu stellen, die nach dem Einrühren in eine kalte Flüssigkeit bei einer bestimmten Konzentration nach kurzer Quelldauer schnittfeste Gele bilden.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst, denn es wurde überraschenderweise gefunden, daß auf Basis von Kartoffelstärken, die im Vergleich zu konventionellen Kartoffelstärken einen erhöhten Amylosegehalt aufweisen, und Walzentrocknung Quellstärken hergestellt werden können, die nach kurzer Quelldauer schnittfeste Gele bilden.

Kartoffelstärken enthalten im Unterschied zu den Getreidestärken Glucoseeinheiten mit Phosphatestergruppen, die ihr spezifische funktionelle Eigenschaften verleihen. Der Phosphatgehalt von Getreidestärken resultiert aus dem Gehalt an Phospholipiden, die in Kartoffelstärke nicht vorkommen. Der überwiegende Anteil der Phosphatestergruppen der Kartoffelstärke ist an die Amylopektinmoleküle gebunden, und zwar hauptsächlich am C<sub>6</sub>-Atom der Glucoseeinheiten, der Rest überwiegend in C<sub>3</sub>-, am wenigsten in der C<sub>2</sub>-Position (Schierbaum, F.: Stärke 21 (1969) 87; Hizukiri, S. et al. Stärke 22 (1970) 338). In funktioneller Hinsicht beeinflußt der Phosphatestergruppengehalt vor allem das Verkleisterungsverhalten der Stärke, die Verkleisterungstemperatur nimmt ab, die Peakviskosität zu, außerdem vermindert er die Retrogradationsneigung der Aufkochungen bzw. Pasten und verbessert ihre Gefrier-Tau-Stabilität.

Der Gesamtposphatgehalt herkömmlicher Kartoffelstärke liegt je nach Sorte und Anbaubedingungen im allgemeinen im Bereich von 10-30µmol Phosphat/g Stärke, und stammt aus den Monophosphatester-Gruppen, da der Lipidgehalt von Kartoffelstärke vernachlässigbar ist.

Aus gentechnisch veränderten Kartoffeln können andererseits Kartoffelstärken gewonnen werden mit Gesamtposphatgehalten bis in die Größenordnung von 120µmol Phosphat/g Stärke.

Der natürliche Amylosegehalt herkömmlicher Kartoffelstärken liegt im allgemeinen in der Größenordnung von 20-25 Gew. %. Zur Erzielung höherer Amylosegehalte muß die native Stärke einer enzymatischen Entzweigung (debranching) unterworfen werden, wobei kurzkettige Amylosemoleküle durch Entzweigung von Amylopektinmolekülen entstehen.

Aus gentechnisch veränderten Kartoffeln können andererseits Kartoffelstärken gewonnen werden mit einem Gehalt an natürlicher (langkettiger) Amylose von über 30 Gew.-% bis in die Größenordnung von über 70 Gew.-%.

Andere Stärken, wie beispielsweise Weizen- oder Maisstärke, besitzen einen höheren Gehalt an natürlicher Amylose, andererseits aber nur einen sehr geringen (Weizenstärke) oder vernachlässigbaren (Maisstärke) Gehalt an Phosphatestergruppen.

Es wurde nun gefunden, daß ein hoher Amylosegehalt einer Stärke zwar die Gelbildung der aus der Stärke gewonnenen Quellstärke begünstigt, aber die Verkleisterungstemperatur der Stärke erhöht und damit den Aufschluß der Stärke und die Bildung der Quellstärke erschwert, daß andererseits aber der Phosphatestergehalt der Stärke dem entgegenwirkt.

Deshalb lehrt die Erfindung Kartoffelstärke einzusetzen, die einen hohen Gehalt an Phosphatestergruppen besitzt, aber eine Kartoffelstärke mit einem im Vergleich zu Kartoffelstärke aus Wildtyppflanzen erhöhten Amylosegehalt. Die Kartoffelstärke enthält im Gegensatz zu Getreidestärken keine Lipide, welche mit Amylose Komplexe bilden und somit die Gel- und/oder Pastenbildung der Quellstärke behindern würden.

Außerdem wurde gefunden, daß durch eine Sprühtrocknung ein Produkt erhalten wird, das einen hohen Anteil unerwünschter löslicher Kohlenhydrate enthält, sodaß erfindungsgemäß eine Walzentrocknung vorgesehen wird. Im Gegensatz zu Amylose-reichen Stärken aus Mais, die unter Normalbedingungen nicht auf der Walze verkleistern, sind Kartoffelstärken mit einem im Vergleich zu Kartoffelstärke aus Wildtyppflanzen erhöhten Amylosegehalt für eine Walzentrocknung geeignet.

Die US 3 607 394 offenbart die Herstellung von Quellstärke durch Wärmebehandlung einer wässrigen Suspension einer Stärke, die mindestens 50% Amylopektin enthält und Walzen- oder Sprühtrocknung. Die so erhaltene Quellstärke soll glatte Pasten bilden und minimale Neigung zur Viskositätssteigerung beim Stehen aufweisen. Ferner wird erwähnt, daß Amylose-reiche Stärken, womit im Falle der US3607394 solche Stärken gemeint sind, die 60% oder mehr Amylose enthalten, Produkte liefern, die bei Rekonstitution mit Wasser Gele bilden, welche nicht die gewünschte Textur aufweisen. Hinsichtlich der einzusetzenden Stärkeart wird nicht kritisch differenziert. Auch wird eine Sprühtrocknung empfohlen, die zu einem unerwünscht hohen Anteil an löslichen Kohlenhydraten führt.

Die EP 480 433 A2 offenbart Nahrungsmittel enthaltend lösliche, Amylose-reiche Stärken ausgewählt unter i) sprühgetrockneten nicht-granulären Stärken, ii) sprühgetrockneten

gelatinieren Stärken und iii) enzymatisch entzweigten gelatinieren Stärken enthaltend mindestens 40% kurzkettiger Amylose. Diese Nahrungsmittel sollen sich durch die Bildung starker Gele auszeichnen. Maisstärken und Erbsenstärken sind die einzigen Stärkearten, die genannt werden, und ein spezieller Aufschluß der Stärke (jet-cooking) ist erforderlich. Es wird ausdrücklich erwähnt, daß bekannte Amylose-reiche Stärken höhere Kochtemperaturen für ihren Aufschluß erfordern als andere Stärken. Eine Walzentrocknung wird als ungeeignet bezeichnet, es sei denn für Stärken mit enzymatisch entzweigten, löslichen Amylose-reichen Stärken.

Im Gegensatz dazu verwendet die vorliegende Erfindung eine Kartoffelstärke mit einem hohen Gehalt an nativer langkettiger Amylose.

Unter kurzkettiger Amylose wird eine solche mit einer maximalen Kettenlänge  $DP_{\max} < 100$ , unter langkettiger Amylose eine solche mit einer maximalen Kettenlänge  $DP_{\max} = 150$  bis 10.000 verstanden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Quellstärke mit guten Gelbildungseigenschaften, worin

- a) eine Suspension aus Stärke und Wasser hergestellt wird,
- b) die in a) hergestellte Suspension auf eine heiße Walze eines Walzentrockners aufgebracht wird; und
- c) die durch Verfahrensschritt b) erhaltene Quellstärke isoliert wird,

wobei das Verfahren erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 30 Gew.-% einsetzt.

Unter dem Begriff „Quellstärke“ wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine physikalisch modifizierte Stärke verstanden, die im Unterschied zu nativer Stärke mit kaltem Wasser oder kalter Milch in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Quellstärke Dispersionen, Pasten oder Gele bildet.

Unter dem Begriff „heiße Walze“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Walze eines Walzentrockners verstanden werden, die eine Temperatur von mindestens 100°C, vorzugsweise zwischen 120°C und 200°C, insbesondere zwischen 140°C und 180°C und besonders bevorzugt zwischen 150°C und 170°C aufweist.

Walzentrockner zur Herstellung von Quellstärke sind dem Fachmann bekannt und sind beispielsweise beschrieben worden in Starch: Chemistry and Technology, Vol. II, Academic Press, New York, San Francisco, London (1967) herausgegeben von R.L. Whistler und E. F. Paschall. Beispielsweise kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein dampfbeheizter Einwalzentrockner mit einer oder mehreren Auftragswalzen (Walzendurchmesser ca. 500-800mm) verwendet werden. Aber auch die Verwendung anderer Walzentrockner, wie z. B. elektrisch beheizter Einwalzentrockner mit Walzendurchmessern von ca. 160 mm, ist möglich.

Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eingesetzten Kartoffelstärken weisen einen Amylosegehalt von mindestens 30% auf, insbesondere 30%-85%, z.B. 30%-65% oder 32%-55%, vorzugsweise 32%-45%.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bestimmung des Amylosegehaltes vorzugsweise über die von Hovenkamp-Hermelink beschriebene colorimetrische Bestimmung des Amylosegehaltes (Potato Research 31, (1988), 241-246).

Vorzugsweise wird in Verfahrensschritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Suspension aus Kartoffelstärke und Wasser in einem Konzentrationsbereich von 5 Gewichtsprozent (= Gew. %) bis 50 Gew. %, bevorzugt von 10 Gew. % bis 40 Gew. %, insbesondere von 15 Gew. % bis 35 Gew. %, besonders bevorzugt von 20 Gew. % bis 30 Gew. % hergestellt.

Die in Verfahrensschritt a) eingesetzte Kartoffelstärke soll einen Gesamtphosphatgehalt von 5-120µmol Phosphat/g Stärke, vorzugsweise von 10-120µmol Phosphat/g Stärke, von 15-110µmol Phosphat/g Stärke und besonders bevorzugt von 60-110µmol Phosphat/g Stärke aufweisen.

Unter dem Begriff "Gesamtphosphatgehalt" der Stärke versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat in C2-, C3- und C6-Position der Glukoseeinheiten. Der Gehalt an phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden, ist von dem Begriff "Gesamtphosphatgehalt" nicht umfaßt.

Wildtyp-Kartoffelpflanzen synthetisieren in der Regel eine Stärke mit einem Amylosegehalt von ca. 17% bis 23% (Bestimmung des Amylosegehaltes nach Hovenkamp-Hermelink). Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eingesetzten Kartoffelstärken mit einem Amylosegehalt von mindestens 30% lassen sich beispielsweise aus transgenen Kartoffelpflanzen isolieren.

Kartoffelstärken aus Pflanzen mit verminderter Genexpression des BEI(=Branching Enzyme I), des BEII(=Branching Enzyme II) und des SSIII(=Soluble Starch Synthase III)-Gens sind grundsätzlich besonders gut geeignet zur Herstellung von erfindungsgemäßen Quellstärken.

Transgene Kartoffelpflanzen, die eine für die vorliegende Erfindung besonders geeignete Stärke mit hohen Amylosegehalten und hohen Phosphatgehalten synthetisieren, werden in der deutschen Patentanmeldung der Anmelderin, eingereicht am 19. Dezember 2002, offenbart.

Aber auch der Einsatz von Kartoffelstärken anderer Herkunft ist denkbar, sofern diese einen Amylosegehalt von mindestens 30% aufweisen.

Die internationale Patentanmeldung WO 97/11188 beschreibt transgene Kartoffelpflanzen, die aufgrund der antisense-Inhibierung des R1-Gens und des BEI-Gens eine Stärke mit einem Amylosegehalt von ca. 30% bis 70% synthetisieren, wobei der Amylosegehalt nach der Methode von Hovenkamp-Hermelink (Potato Research 31, (1988), 241-246) bestimmt wurde. Der Phosphatgehalt dieser Kartoffel-Stärken ist im Vergleich zum Phosphatgehalt von Stärke aus Wildtyppflanzen verringert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stammt die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Kartoffelstärke aus Kartoffelpflanzen, die eine im Vergleich zu entsprechenden Wildtyppflanzen verminderte Genexpression des R1- und des BEI-Gens aufweisen (siehe WO 97/11188).

Im Vergleich zu Maisstärken mit Amylosegehalten von ca. 50% (Gelose®) bzw. 70% (Hylon VII®) weisen die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendeten Kartoffelstärken den Vorteil auf, daß sie mit Hilfe des Walzentrockners ausreichend

aufgeschlossen werden können. Im Falle der Maisstärken mit Amylosegehalten von ca. 50% bzw. 70% ist der Aufschluß mit dem Walzentrockner unzureichend, so daß die durch Walzentrocknung gewonnenen Produkte beim Anrühren mit kaltem Wasser im relevanten Konzentrationsbereich keine Paste oder Gel bilden.

In Verfahrensschritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Stärkesuspension vorzugsweise zwischen 2 Sekunden (Sekunden = s) und 120 s, vorzugsweise zwischen 3 s und 60 s, insbesondere zwischen 3 s und 30s und besonders bevorzugt zwischen 5 s und 20 s auf die heiße Walze des Walzentrockners aufgebracht.

Die isolierte Quellstärke wird in Anschluß an Verfahrensschritt c) vorzugsweise gekühlt, vorzugsweise an der Luft gekühlt, und/oder anschließend zerkleinert beispielsweise mit einer Mühle.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die in Verfahrensschritt a) hergestellte Suspension vor dem Aufbringen auf die heiße Walze des Walzentrockners teilweise oder vollständig verkleistert.

Unter dem Begriff „vollständig verkleistert“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß die Stärkesuspension vor dem Auftragen auf die Walze für bestimmte Zeit, wie z.B. für 5 Minuten, auf eine bestimmte Temperatur, z.B. 95°C, erhitzt wird, bis sich die Struktur der Stärkekörner aufgelöst hat und mindestens 80%, vorzugsweise 90% der Stärkekörner unter polarisiertem Licht im Lichtmikroskop keine Lichtdoppelbrechung mehr zeigen.

Die Bestimmung des Anteils an Stärkekörnern, die unter polarisiertem Licht im Lichtmikroskop keine Lichtdoppelbrechung zeigen, kann hierbei mit Hilfe eines Mikroskops unter polarisiertem Licht erfolgen, wie beispielsweise beschrieben in Eberstein et al., Starch/Stärke 32, (1980), 397-404.

Unter dem Begriff „teilweise verkleistert“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß die Stärkesuspension vor dem Auftragen auf die Walze für bestimmte Zeit, z.B. für 5 Minuten, auf eine bestimmte Temperatur, z.B. 65°C, erhitzt wird, bis die Bildung eines Stärkekleisters einsetzt und sich die Struktur der Stärkekörner

aufgelöst hat und 25%-60%, vorzugsweise 30%-50% der Stärkekörner unter polarisiertem Licht im Lichtmikroskop keine Lichtdoppelbrechung mehr zeigen.

Die Bestimmung des Anteils an Stärkekörnern, die unter polarisiertem Licht im Lichtmikroskop keine Lichtdoppelbrechung zeigen, kann auch hier mit Hilfe eines Mikroskops unter polarisiertem Licht erfolgen, wie beispielsweise beschrieben in Eberstein et al., Starch/Stärke 32, (1980), 397-404.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Quellstärke, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist eine Zusammensetzung enthaltend eine erfindungsgemäße Quellstärke.

Unter dem Begriff „Zusammensetzung“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Mischung verstanden werden, die u.a. die erfindungsgemäße Quellstärke enthält.

Beispielsweise fallen unter den Begriff Zusammensetzung Backmischungen, Mischungen zur Herstellung von Süßwaren, Instant-Puddings, Instant-Desserts, Fruchtfüllungen, Kaltcremes oder Soßen. Ferner umfaßt der Begriff „Zusammensetzung“ Mischungen zur Herstellung von Futtermitteln, Wäschestärke, Farben und/oder Klebstoffen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung eines Instant-Puddings auf Basis der erfindungsgemäßen Quellstärke sowie den Instant-Pudding, der mittels der erfindungsgemäßen Quellstärke hergestellt werden kann.

Die Erfindung umfaßt somit auch ein Verfahren zur Herstellung von Instant-Pudding, worin

- a) eine erfindungsgemäße Zusammensetzung enthaltend die erfindungsgemäße Quellstärke homogen in einer Flüssigkeit vermischt wird;
- b) die in Verfahrensschritt a) erzeugte Mischung stehen gelassen wird bis eine Gelbildung eintritt.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei der Flüssigkeit um Milch und/oder um Wasser.

Die Quellstärke in Verfahrensschritt a) wird in einem Konzentrationsbereich von 2 Gew % bis 15 Gew %, vorzugsweise von 4 Gew % bis 12 Gew % und besonders bevorzugt von 5% Gew % bis 9% Gew % eingesetzt.

Die Temperatur in Verfahrensschritt a) des Verfahrens zur Herstellung von Instant-Pudding kann 5°C bis 50°C, vorzugsweise 10°C bis 30°C und besonders bevorzugt 15°C bis 25°C betragen.

Die Temperatur in Verfahrensschritt b) des Verfahrens zur Herstellung von Instant-Pudding beträgt -15°C bis 50°C, vorzugsweise von 0°C bis 35°C und besonders bevorzugt Raumtemperatur 15°C bis 30°C, insbesondere 20°C bis 25°C.

Neben der Quellstärke kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung, im Zusammenhang mit der Herstellung von Instant-Pudding, weitere Zutaten enthalten, wie z.B. Zucker und/oder CaCl<sub>2</sub> und/oder Aromastoffe und/oder Kochsalz und/oder Farbstoffe und/oder pflanzliches Fett und/oder Emulgatoren und/oder andere Quellstärken.

Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine Trockenmischung zur Herstellung eines Instant-Puddings enthaltend 2-15 Gew. %, vorzugsweise 5-9 Gew. % einer erfindungsgemäßen Quellstärke, sowie Zucker und Aromastoffe und gegebenenfalls weitere in Puddings übliche Zusätze.

Neben der erfindungsgemäßen Quellstärke sind keine weiteren Gelierungsmittel, wie z.B. Alginat und/oder Carrageenan und/oder Gelatine, erforderlich.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Zusammensetzungen zur Herstellung von Instant-Pudding weisen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen in dieser Ausführungsform der Erfindung den Vorteil auf, daß sie ohne zusätzliches Erhitzen beispielsweise in Wasser oder in Milch, vorzugsweise bei Raumtemperatur, angerührt werden können und ohne Zusatz von Gelierungsmitteln, wie z.B. Alginat und/oder Carrageenan und/oder anderer Hydrokolloide, formstabile, sturzfähige und schnittfähige Gele bilden.

Im Vergleich zu herkömmlichen Zusammensetzungen zur Herstellung von Instant-Pudding weisen die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen zudem den Vorteil auf, daß sich feste Gele, vorzugsweise schnittfeste Gele, bereits nach kurzer Stehzeit ausbilden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter dem Begriff „feste Gele“ eine Gelfestigkeit von mindestens 0.8 N, vorzugsweise von mindestens 1.0 N, insbesondere zwischen 1.1 N und 4.5 N, vorzugsweise zwischen 1.2 N und 4.0 N und besonders bevorzugt zwischen 1.3 N und 3.6 N, und zwar bei einer eingesetzten Stärkekonzentration von 6.8 Gew-% in wäßriger Lösung unter Zusatz von Zucker und  $\text{CaCl}_2$ . Die Bestimmung der Gelfestigkeit erfolgt hierbei mit Hilfe eines Texture Analyzers wie weiter unten beschrieben.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung versteht man unter dem Begriff „kurze Stehzeit“ eine Stehzeit bei 15°C bis 25°C, vorzugsweise bei 20°C, und Normaldruck von weniger als 3 h, vorzugsweise von weniger als 2 h und besonders bevorzugt von weniger als 1 h.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ist, daß sie im Vergleich zu herkömmlichen Zusammensetzungen zur Herstellung von Instant-Puddings Gele bilden, die durch eine hohe Formstabilität gekennzeichnet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen dadurch gekennzeichnet, daß sie in Wasser oder Milch Gele ausbilden, die eine hohe Formstabilität aufweisen.

Unter dem Begriff „hohe Formstabilität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Formstabilität von mindestens 80%, vorzugsweise von mindestens 85%, insbesondere von mindestens 90% und besonders bevorzugt von mindestens 95% verstanden werden.

Die Methode zur Bestimmung der Formstabilität ist weiter unten beschrieben.

Der erfindungsgemäße Instant-Pudding zeichnet sich durch eine schnittfeste Textur aus und/oder durch eine hohe Stabilität der Gelstruktur und/oder durch eine hohe Homogenität des Gels.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Quellstärke oder der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthaltend solche Quellstärke zur Herstellung von Lebensmitteln, Lebensmittelzusammensetzungen oder Lebensmittelvorprodukten, insbesondere zur Herstellung von Back- und Süßwaren, Instant-Puddings, Instant-Desserts, Fruchtfüllungen, Dessertpulvern, Kaltcremepulvern oder Soßenpulvern, ferner zur Herstellung von Futtermitteln, vorzugsweise als Komponente für Milchaustauschfutter, ferner zur Herstellung von Wäschestärke, als Zusatz zu Farben, als Klebstoff für Papier und Pappe und/oder als Binder für Grillkohle.

## Methoden

### 1. Bestimmung der Löslichkeit und des korrigierten Wasserbindevermögens von Quellstärke

Die Bestimmung der Löslichkeit und des Wasserbindevermögens der Quellstärke erfolgte bei Raumtemperatur ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ) in Anlehnung an die von Richter, Augustat und Schierbaum (Ausgewählte Methoden der Stärkechemie, Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1968), 111) beschriebene Arbeitsweise.

Es wurden 0,5 g Quellstärke -Trockensubstanz in einen Zentrifugenbecher (100 ml) eingewogen, mit 1 ml Ethanol benetzt, dann mit 40 mL dest. Wasser mit Hilfe eines Magnetstäbchens und eines Rührgeräts 30 min dispergiert bzw. gequollen, anschließend das Magnetstäbchen entfernt, mit 10 mL dest. Wasser gespült, danach 10 min zentrifugiert ( $2.800 \times g$ ). Der Überstand wurde filtriert (Faltenfilter), vom Filtrat 10 g in ein Wägeschälchen gegeben und bei  $105^\circ\text{C}$  über Nacht getrocknet, danach das Sediment gewogen.

Die Berechnung der Löslichkeit erfolgte nach der Formel:

$$\text{Löslichkeit (\%)} = \frac{\text{Eingedampftes Filtrat (gTS)} \times 50 \times 100}{\text{Särkeeinwaage (gTS)} \times 10}$$

Die Berechnung des Wasserbindevermögens (WBV) erfolgte nach der Formel:

$$\text{WBV (g/g)} = \frac{\text{Sediment (g)} - \text{Särkeeinwaage (gTS)}}{\text{Särkeeinwaage (gTS)}}$$

Die Berechnung des um die Löslichkeit korrigierten Wasserbindevermögens ( $\text{WBV}_{\text{korr}}$ ) erfolgte nach der Formel:

$$\text{WBV}_{\text{korr}} \text{ (g/g)} = \frac{[\text{Sediment (g)} - \text{Särkeeinwaage (gTS)}] \times 100}{\text{Särkeeinwaage (gTS)} \times [100 - \text{Löslichkeit (\%)}]}$$

## 2. Bestimmung der Gelfestigkeit des Puddings

Die Messung der Gelfestigkeit erfolgte mit einem Texture-Analyser (TA.XT2 Stable Mikro Systems, Heslemare Surrey GU 27 3AY, GB). Ein bei Raumtemperatur ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) angerührter Pudding hergestellt aus 4.0 g Quellstärke, 5.0 g Zucker, 50ml Wasser bzw. 50 ml Milch sowie 0.1g  $\text{CaCl}_2$  wurde unmittelbar nach der Zubereitung in ein zylindrisches Gefäß aus zwei übereinander liegenden Ringen (je 20 mm hoch;  $\varnothing = 25$  mm) überführt und dann zwei Stunden im Kühlschrank ( $8-10^\circ\text{C}$ ) gelagert. Die Messung der Gelfestigkeit erfolgte durch einmaliges Komprimieren des Gels mit einer ebenen Kalotte ( $\varnothing_m 24,5$  mm). Eine plane Geloberfläche wurde erhalten, indem das Gel zwischen den beiden Ringen mit einem Messer durchgeschnitten wurde.

## Meßbedingungen:

Graph Type	: Force v Time
Force Threshold	: 0,196 N
Contact Area	: 471 mm <sup>2</sup>
Contact Force	: 0,0490 N
Mode	: Measure Force in Compression
Option	: Cycle until Count
Force Units	: Newton
Test Speed	: 2,0 mm/s
Distance	: 1,0 mm
Trigger Force	: 0,097 N

### 3. Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)

Bei der Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels des Rapid Visco Analyzers (RVA) (Rapid Visco Analyser, Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) wurde eine Suspension von 2 g Kartoffelstärke in 25 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen: 60 s bei 50 C suspendieren, aufheizen von 50 C auf 95 C mit 12 /min., 2,5 Minuten konstant halten, abkühlen auf 50 C mit 12 C/min. und abermals 2 Minuten konstant halten. Das RVA-Temperaturprofil lieferte die viskosimetrischen Parameter der untersuchten Stärken für die maximale (Max) und Endviskosität (Fin), die Verkleisterungstemperatur (T), die nach der maximalen Viskosität auftretende minimale Viskosität (Min) sowie die Differenz aus minimaler und Endviskosität (Setback, Set).

### 4. Bestimmung der Formstabilität (Standfestigkeit)

Ein bei Raumtemperatur (23±2°C) angerührter Pudding wurde unmittelbar nach der Zubereitung in einen mit einer Polypropylenfolie ausgelegten Plexiglaszylinder (20 mm hoch; Ø = 25 mm) überführt, die Oberfläche glattgestrichen, dann 90 min im Kühlschrank (8-10°C) zur Gelierung abgestellt. Anschließend wurde das zylindrische Gefäß (Stützring) entfernt, nach 5 min die Höhe des Puddings gemessen und die Formstabilität wie folgt berechnet:

$$\text{Formstabilität (\%)} = \frac{B \times 100}{A}$$

A = Höhe des Stützrings

B = Höhe des Puddings nach Entfernen des Stützrings

#### 5. Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes der Stärke

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Hierzu werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

Es folgt eine photometrische Bestimmung bei 820nm unter Berücksichtigung einer Phosphat-Eichreihe als Standard.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

## Beispiel 1

### Herstellung von Quellstärke aus amylosereichen Kartoffelstärken

Zur Herstellung von Quellstärke wurde Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von ca. 35%-45% (Bestimmung des Amylosegehaltes nach Hovenkamp & Hermelink), die aus transgenen Kartoffelpflanzen mit gleichzeitig verringerter Genexpression des R1-Gens und des Branching Enzyme I - Gens (wie beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 97/11188 A1 beschrieben) gewonnen wurde und die im folgenden als HA-Stärke bezeichnet werden soll, mit Hilfe eines Walzentrockners physikalisch modifiziert.

Zur Herstellung der Quellstärke wurde ein Crepes-Maker der Firma La Monferrina, Italien, Modell C verwendet. Es handelt sich um einen elektrisch beheizten Einwalzentrockner mit einem Walzendurchmesser von ca. 160 mm, der mit einer Drehzahl von 3 Umdrehungen pro Minute (= Upm) und einer Walzentemperatur zwischen 160°C und 190°C betrieben wurde. Die Verweilzeit der Stärkesuspension auf der Walze beträgt ungefähr 12 Sekunden bei einer Drehzahl von 3 Upm. Das Produkt wurde von der Walze abgenommen, bevor die Walze eine volle Umdrehung gemacht hat.

Die Herstellung der Quellstärke mit dem modifizierten Crepes-Maker erfolgte durch Aufbringen der Stärkesuspension mit Hilfe eines Auftragschachts auf die heiße Walzenoberfläche. Der Produktfilm wurde mit einem Messer abgenommen, an der Luft gekühlt, über Nacht offen äquilibriert, dann mit einer Mühle (Modell ZM 100, Siebkranz 0,2 mm) der Firma Retsch GmbH & Co KG (Haan, Deutschland) bei 10000 Upm zerkleinert.

Die Quellstärkeherstellung erfolgte mit einer 12,5%igen Stärkesuspension, die auf die 160-190°C heiße Walze aufgetragen wurde. Im Auftragschacht wurde die Stärke jeweils partiell vorverkleistert.

**Beispiel 2****Herstellung eines Instant-Puddings**

4.0 g Quellstärke, hergestellt aus HA-Kartoffelstärke (Beispiel 1), 5.0 g Puderzucker, 0.1 g  $\text{CaCl}_2$  wurden homogen vermischt, dann zusammen mit 50 ml Vollmilch (3.5% Fett) in ein Becherglas gegeben und mit einem Krupps-3-Mix (einzelner Schneebesen) der Firma Krupps (Deutschland) 3 min auf höchster Stufe gerührt. Diese Mischung wurde anschließend für 2 Stunden im Kühlschrank bei Temperaturen zwischen 8°C bis 10° stehen gelassen, bevor die Gelfestigkeit nach der oben beschriebenen Methode bestimmt wurde.

Das zum Vergleich in die Untersuchungen einbezogene Handelsprodukt zur Herstellung von Instant Puddings enthielt nach Herstellerangaben die folgenden Zutaten: Zucker, modifizierte Stärke, pflanzliches Fett gehärtet, Glukosesirup, Emulgator (verestertes Mono- und Diglycerid), Milcheiweiß, Verdickungsmittel (Carrageenan, Alginat), Kochsalz, Farbstoff (Carotin, Riboflavin), Aroma. Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben durch Einrühren von 12.0 g des Handelsproduktes in 50 ml Milch.

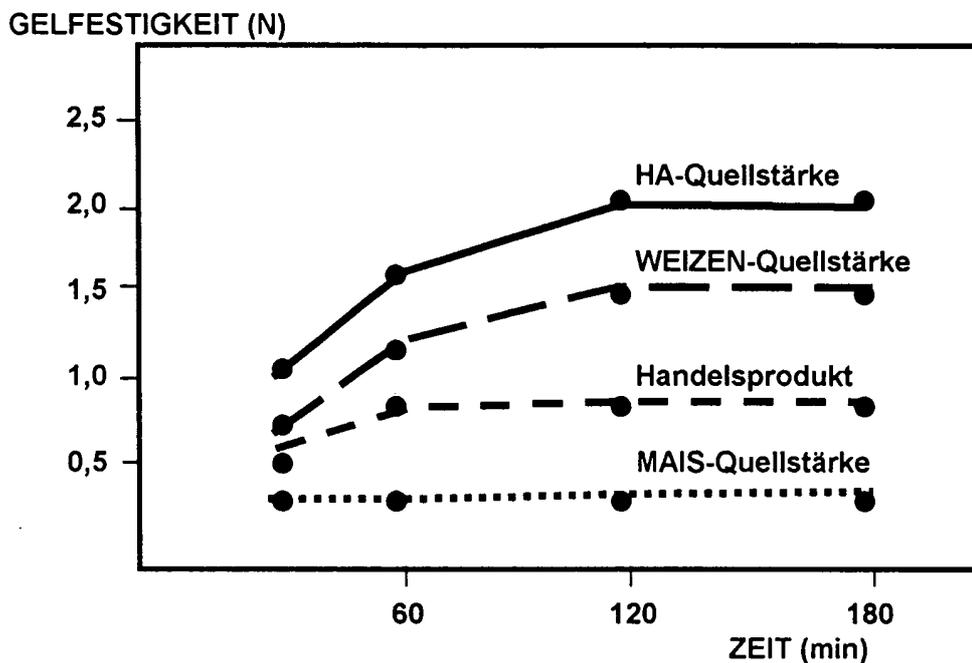
Die Dichtung des Handelsproduktes beruht primär auf der Gelierung des Alginats und Carrageenans. Die deklarierte modifizierte Stärke, eine Quellstärke, wird als Füllstoff bzw. zur „Körperbildung“ zugesetzt. Im Unterschied dazu bedarf es für die Gelierung im Falle des Puddings mit Quellstärke aus amylosereichen Kartoffelstärkevarietäten (HA) keines Zusatzes der vorgenannten Hydrokolloide.

Im Vergleich zum Handelsprodukt (Tabelle 1) zeichnen sich die Instant-Puddings, die auf Basis von Quellstärken aus amylosereichen Kartoffelstärken (Beispiel 1; HA-Stärke) hergestellt wurden, insbesondere durch eine charakteristische schnittfeste Textur des Puddings aus.

Tabelle 1: Gelfestigkeit und Struktur in Milch kalt angerührter Puddingproben aus HA-Quellstärke im Vergleich zu einem Handelsprodukt

PROBE	GELFESTIGKEIT	STRUKTURBESCHREIBUNG
HA	2.0 N	GEL WEICH, HOMOGEN, SCHNITTFEST
Handelsprodukt	0.7 N	GEL NICHT SCHNITTFEST

Die weiteren Untersuchungen der Eigenschaften der Quellstärke aus der Kartoffelstärke HA waren dahingehend ausgerichtet, die rheologischen Eigenschaften eines damit hergestellten Puddings wie die Gelbildungsgeschwindigkeit, die viskosen Anteile, die Elastizität und Plastizität des Puddings näher zu beschreiben und mit denen aus Handelsstärken bzw. -produkten zubereiteten zu vergleichen.



Figur 1: Einfluß der Zeit auf die Festigkeit von Quellstärkepudding und einem Instant-Pudding, der aus dem Handelsprodukt hergestellt wurde (Texture Analyser)

Die Gelfestigkeit gleichartig hergestellter Puddingproben (die Herstellung erfolgte wie oben für den Pudding aus HA-Quellstärke beschrieben), die aus Quellstärken unterschiedlicher Herkunft erzeugt wurden, wurde nach unterschiedlich langer Stehzeit bei Raumtemperatur mit dem Texture Analyser gemessen. Aus der Figur 1 ist an der zeitlichen Zunahme der Gelfestigkeit der Puddingproben zunächst zu erkennen, daß die maximale Gelfestigkeit um so schneller erreicht war, je niederviskoser die Zubereitung war und daß sie im Falle der stärkeren Gele bis zu zwei Stunden anstieg.

Der Pudding, der aus Quellstärke von HA-Kartoffelstärke hergestellt wurde, weist im Gegensatz zu den Vergleichspuddings eine schnittfeste Textur auf.

Die Schnitffestigkeit der Textur läßt sich auch indirekt verdeutlichen, in dem man die Formstabilität der Puddings nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Vergleicht man die Formstabilität von Puddings miteinander, die aus verschiedenen Quellstärketypen erzeugt wurden, so erkennt man, daß die Puddings, die aus Quellstärke von HA-Stärke erzeugt wurden (Herstellung siehe oben) im Vergleich zu Puddings, welche auf gleiche Weise (4.0 g Quellstärke, 5.0g Puderzucker, 0.1g CaCl<sub>2</sub> in 50ml Milch) aus anderen Quellstärketypen (Maisquellstärke, Weizenquellstärke, Kartoffelquellstärke) hergestellt wurden, eine wesentliche höhere Formstabilität aufweisen. Gleiches gilt im Vergleich zu dem aus dem oben beschriebenen Handelsprodukt hergestellten Pudding.

Ergebnis:

STÄRKE	FORMSTABILITÄT
HA	98 %
MAISQUELLSTÄRKE	71 %
WEIZENQUELLSTÄRKE	42 %
KARTOFFELQUELLSTÄRKE	77 %
HANDELSPRODUKT	80 %

Die Eignung der einzelnen Quellstärken für die Herstellung eines Instant-Desserts läßt sich sensorisch eindeutig gegeneinander abgrenzen. Eine andere Möglichkeit bietet die bildliche Wiedergabe der Puddingproben, die nach dem Anrühren zwei Stunden bei Raumtemperatur abgestellt und danach gestürzt wurden. Anhand des Aussehens und der Schnittfläche der Proben ist deutlich zu erkennen, daß die gewünschte schnitffeste Struktur nur im Falle des Puddings mit der Quellstärke aus HA erzielt wurde. Damit ist ein wichtiger Beleg für das außergewöhnliche Verhalten dieser Stärke erbracht, das sich mit Quellstärken aus anderen Stärkearten offenbar nicht erzielen läßt.

### Beispiel 3

#### Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine verringerte Genexpression eines BEI-, SSIII-, und eines BEII-Gens aufweisen

##### Herstellung des Expressionsvektors ME5/6

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989), 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Die T-DNA enthält an Position 198-222 die rechte Randsequenz der TL-DNA aus dem Plasmid pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846). Zwischen Nukleotid 223-249 befindet sich eine Polylinker-Sequenz. Die Nukleotide 250-1634 enthalten die P35S3 Promotor-Region des Blumenkohl-Mosaik-Virus (Odell et al., siehe oben). Die kodierende Sequenz des Phosphinothricin-Resistenzgen (*bar*) aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al. 1987, siehe oben) ist zwischen den Nukleotiden 1635-2186 enthalten.

Dabei wurden die zwei endständigen Codons am 5'-Ende des *bar*-Wildtyp-Gens ersetzt durch die Codons ATG und GAC. Zwischen den Nukleotiden 2187-2205 befindet sich eine Polylinker-Sequenz. Das 260 bp lange *TaqI*-Fragment des nicht-translatierten 3'-Endes des Nopalinsynthase-Gens (3'nos) aus der T-DNA des Plasmides pTiT37 (Depicker et al., J. Mol. Appl. Genet. 1, (1982), 561-573) befindet sich zwischen den Nukleotiden 2206 und 2465. Die Nukleotide 2466-2519 enthalten eine Polylinker-Sequenz. Die linke Randsequenz der TL-DNA aus pTiB6S3 (Gielen et al., EMBO J. 3, (1984), 835-846) befindet sich zwischen den Nukleotiden 2520-2544.

Der Vektor pGSV71 wurde dann mit dem Enzym *PstI* aufgeschnitten und geglättet. Aus dem Vektor pB33-Kan wurde der B33 Promotor sowie die *ocs*-Kassette als *EcoRI-HindIII*-Fragment ausgeschnitten und geglättet und in den mit *PstI* aufgeschnittenen und geglätteten Vektor pGSV71 eingefügt. Der erhaltene Vektor diente als Ausgangsvektor zur Konstruktion von ME5/6: In die zwischen B33-Promotor und *ocs*-Element gelegene *PstI*-Schnittstelle des Vektors ME4/6 wurde ein Oligonukleotid, enthaltend die Schnittstellen *EcoRI*, *PacI*, *SpeI*, *SrfI*, *SpeI*, *NotI*, *PacI* und *EcoRI*, unter Verdopplung der *PstI*-Schnittstelle eingeführt. Der erhaltene Expressionsvektor wurde als ME5/6 bezeichnet.

#### Beschreibung des Vektors pSK-Pac:

pSK-Pac ist ein Derivat des pSK-Bluescript (Stratagene, USA) bei dem flankierend zur multiplen Klonierungsstelle (MCS) je eine *PacI* Schnittstelle eingeführt wurde.

#### Herstellung transgener Pflanzen:

Zur Erzeugung transgener Pflanzen, die eine verringerte Aktivität eines BEI-, eines SSIII- und eines BEII-Proteins aufweisen, wurden zunächst transgene Pflanzen erzeugt, die eine verringerte Aktivität eines BEI- und eines SSIII-Proteins aufweisen. Zu diesem Zwecke wurde die T-DNA des Plasmids pB33-aBEI-aSSIII-Kan mit Hilfe von Agrobakterien, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, in Kartoffelpflanzen transferiert. Zur Konstruktion des Plasmids pB33-aBEI-aSSIII-Kan wurde zunächst der Expressionsvektor pBin33-Kan konstruiert. Dazu wurde der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989, siehe oben) als *DraI*-Fragment (Nukleotide -1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19 (Genbank Acc. No. M77789), dessen Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert.

Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und *SmaI* herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBin33-Kan. Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des Vektorplasmids pBin19 (Bevan, Nucl. Acid Research 12, (1984), 8711-8721) und wurde von Höfgen and Willmitzer (Plant Sci. 66, (1990), 221-230) konstruiert. Anschließend wurde ein 1631 Bp langes *HindIII*-Fragment, welches eine partielle cDNA kodierend für das BEI-Enzym aus Kartoffel enthält (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230(1-2):39-44), geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33 Promotors (Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum*; Rocha-Sosa et al., 1989) in den mit *SmaI* vorgeschnittenen Vektor pBinB33 eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* aufgeschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 1363 Bp langes *BamHI*-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für das SS III-Enzym aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

Nach der Transformation konnten verschiedene Linien transgener Kartoffelpflanzen identifiziert werden, deren Knollen einen deutlich verringerte Aktivität eines BEI- und SSIII-Proteins aufwiesen. Die aus dieser Transformation resultierenden Pflanzen wurden mit 038VL bezeichnet.

Zum Nachweis der Aktivität löslicher Stärkesynthasen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurden Gewebeproben von Kartoffelknollen in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10 % Glycerin und 0,4 mM PMSF aufgeschlossen. Die Elektrophorese wurde in einer MiniProtean II Kammer (BioRAD) durchgeführt. Die Monomerkonzentration der 1,5 mm dicken Gele war 7,5 % (w/v), als Gel- und Laufpuffer diente 25 mM Tris-Glycin pH 8,4. Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden aufgetragen und für 2 h bei 10 mA je Gel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Aktivitäts-Gele in 50 mM Tricine-NaOH pH 8,5, 25 mM Kaliumacetat, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glukose, 0,1 % (w/v) Amylopektin und 0,5 M Natriumcitrat. Gebildete Glukane wurden mit Lugolscher Lösung angefärbt.

Der Nachweis der BEI Aktivität erfolgte ebenfalls mit Hilfe der nicht denaturierenden Gelelektrophorese:

Zur Isolierung von Proteinen aus Pflanzen wurde das Probenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, in Extraktionspuffer (50 mM Na-Citrat, pH 6.5; 1 mM EDTA, 4 mM DTT)

aufgenommen und nach Zentrifugation (10 min, 14.000 g, 4 °C) direkt zur Messung der Proteinkonzentration nach Bradford eingesetzt. Anschließend wurde je nach Bedarf 5 bis 20 µg Gesamt-Proteinextrakt mit 4-fach Loading-Buffer (20% Glycerin, 125 mM Tris HCl, pH 6,8) versetzt und auf ein „BE-Aktivitätsgel“ geladen. Der Laufpuffer (RB) setzte sich wie folgt zusammen: RB = 30,2 g Tris-Base, pH 8,0, 144 g Glycine auf 1 L H<sub>2</sub>O.

Nach Beendigung des Gellaufes wurden die Gele in je 25 ml „Phosphorylase – Puffer“ (25 ml 1M Na-Citrat pH 7,0, 0,47 g Glucose-1-Phosphat, 12,5 mg AMP, 2,5mg Phosphorylase a/b aus „rabbit“) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Färbung der Gele wurde mit Lugolscher Lösung durchgeführt.

Weitergehende Analysen zeigten, daß isolierte Stärken der Linie 038VL008 und 038VL107, welche eine Reduzierung sowohl des BEI-, als auch des SSIII-Proteins aufweisen, den höchsten Phosphatgehalt aller untersuchten unabhängigen Transformanten aufwiesen.

Pflanzen dieser Linien wurden anschließend wie beschrieben bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) mit dem Plasmid pGSV71-aBE2-basta (siehe internationale Patentanmeldung PCT/EP02/06265) transformiert.

Von den durch Transformation mit dem Plasmid pGSV71-aBE2-basta erhaltenen Pflanzen, die als 108CF bzw. 110CF bezeichnet wurden, wurden Gewebeproben von Knollen der unabhängigen Transformanten genommen und deren Amylosegehalt ermittelt (Hovenkamp-Hermelink, Potato Research 31, (1988), 241-246). Die Stärken der unabhängigen Linien, deren Knollen den höchsten Amylosegehalt aufwiesen, wurden für eine weitere Analyse der Stärkeigenschaften herangezogen. Zum Nachweis, daß diese Pflanzen zusätzlich zu einer reduzierten Aktivität eines BEI- und SSIII-Proteins auch eine reduzierte Aktivität eines BEII-Proteins aufweisen, wurde ebenfalls eine Analyse mit Hilfe der nicht denaturierenden Gelelektrophorese durchgeführt. Die Analyse wurde mit der gleichen Methode wie oben bereits für die Analyse der reduzierten BEI-Aktivität durchgeführt, mit dem Unterschied, daß das nicht denaturierende Polyacrylamidgel zusätzlich zur oben beschriebenen Zusammensetzung 0,5% Maltodextrin (Beba, Maltodextrin-Lösung 15%ig für Neugeborene, Nestle) enthielt. Durch Zusatz des Dextrins konnten die unterschiedlichen Aktivitäten der BEI- und BEII-Proteine nach

Inkubation der Gele in „Phosphorylase – Puffer“ (25 ml 1M Na-Citrat pH 7,0, 0,47 g Glucose-1-Phosphat, 12,5 mg AMP, 2,5mg Phosphorylase a/b aus „rabbit“) über Nacht bei 37 °C und anschließender Färbung mit Lugolscher Lösung in einem Gel dargestellt werden.

## Beispiel 4

### Herstellung von Quellstärke aus amylosereicher Kartoffelstärke mit erhöhtem Phosphatgehalt und Verwendung dieser Quellstärke zur Herstellung von Instant-Puddings

Die von den in Beispiel 3 beschriebenen transgenen Pflanzen synthetisierte, modifizierte Stärke, die im folgenden als „HA-Phospat“ bezeichnet wird, weist einen Amylosegehalt zwischen 32% und 38% sowie einen Phosphatgehalt zwischen 80,0 und 100  $\mu\text{mol}$  Gesamtphosphat/ g Trockengewicht der Stärke auf.

Diese Stärke wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, zur Herstellung von Quellstärke eingesetzt. Anschließend wurde die so erhaltenen Quellstärke zur Herstellung eines Instant-Puddings verwendet. Die Herstellung des Puddings erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Die Eigenschaften des Puddings können analog Beispiel 2 in folgender Weise beschrieben werden:

Tabelle 2: Gelfestigkeit und Struktur in Milch kalt angerührter Puddingproben aus HA-Phosphat-Quellstärke im Vergleich zu einem Handelsprodukt

Probe	Gelfestigkeit	Strukturbeschreibung
HA-Phosphat	2.7 N	Gel schnittfest, homogen
Handelsprodukt	0.7 N	Gel nicht schnittfest

Die schnittfesten Gele bildeten sich unter den in Beispiel 2 beschriebenen Versuchsbedingungen bereits nach relativ kurzer Stehzeit (ca. 30 Minuten) aus, teilweise sogar bereits nach 10 bis 15 Minuten.

Betrachtet man die Formstabilität der HA-Phosphat-Quellstärken, so liegt diese im für die HA-Quellstärke (Beispiel 2) beschriebenen Bereich und beträgt 98%.

Patentansprüche

- 1.) Verfahren zur Herstellung einer Quellstärke mit guten Gelbildungseigenschaften, worin
  - a) eine Suspension aus Stärke und Wasser hergestellt wird,
  - b) die in a) hergestellte Suspension auf eine heiße Walze eines Walzentrockners aufgebracht wird, und
  - c) die durch Verfahrensschritt b) erhaltene Quellstärke isoliert wird,dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt von mindestens 30 Gew.-% einsetzt.
- 2.) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt zwischen 30 % und 85 % einsetzt.
- 3.) Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt zwischen 30 % und 65 % einsetzt.
- 4.) Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt zwischen 32 % und 55 % einsetzt.
- 5.) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Amylosegehalt zwischen 32 % und 45 % einsetzt.
- 6.) Verfahren nach einem der vorgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Gesamtphosphatgehalt von 5-120µmol Phosphat/g Stärke einsetzt.
- 7.) Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Kartoffelstärke mit einem Gesamtphosphatgehalt von 60-110µmol Phosphat/g Stärke einsetzt.

- 8.) Quellstärke erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7.
- 9.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung schnittfester Gele.
- 10.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung von Lebensmitteln.
- 11.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung von Instant-Puddings.
- 12.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung von Futtermitteln.
- 13.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung von Klebstoffen.
- 14.) Verwendung einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7 zur Herstellung von Farben.
- 15.) Zusammensetzung enthaltend eine Quellstärke nach Anspruch 8.
- 16.) Trockenmischung zur Herstellung eines Instant-Puddings enthaltend 2-15 Gew.-%, vorzugsweise 5-9 Gew.-% einer Quellstärke hergestellt in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, sowie Zucker und Aromastoffe und gegebenenfalls weitere in Puddings übliche Zusätze.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/14600

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 7 C08B30/14 A23L1/0522 A23K1/00 C09J103/02 C09D103/02  
C08L3/02

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08B

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

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

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 11375 A (AMYLOGENE HB) 9 July 1992 (1992-07-09) page 7, line 26 - line 31 page 8, line 9 - line 10 page 10 -page 11; example 2 page 12; example 6 claim 17	1-8
X	US 3 515 591 A (JACOB R. FELDMAN) 2 June 1970 (1970-06-02) column 2, line 38 - line 61 column 4, line 29 - line 50; example 1 claims	1-16
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 2003

Date of mailing of the international search report

17/04/2003

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Mazet, J-F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/14600

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 086 890 A (ANATOLE SARKO ET AL.) 23 April 1963 (1963-04-23) column 1, line 10 - line 19 column 2, line 14 - line 27 column 3, line 10 -column 4, line 10 claims; examples ---	1-16
P,X	EP 1 179 298 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 13 February 2002 (2002-02-13) page 3, line 6 - line 16 page 3, line 26 - line 37 ---	1-8,10, 15
A	US 3 128 209 A (FELIX J. GEMINO ET AL.) 7 April 1964 (1964-04-07) column 1, line 10 - line 18 examples ---	1-16
A	WO 97 11188 A (PLANTEC BIOTECHNOLOGIE GMBH) 27 March 1997 (1997-03-27) cited in the application page 27, line 12 -page 33, line 18 ---	1-16
A	WO 95 07355 A (INSTITÜT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 16 March 1995 (1995-03-16) page 2, line 5 - line 7 page 2, line 17 - line 31 claims 18-20 ---	1-16
A	EP 0 108 833 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL CORPORATION) 23 May 1984 (1984-05-23) example III ---	1,11,16
A	US 4 251 556 A (BURKWALL JR. ET AL.) 17 February 1981 (1981-02-17) column 3, line 63 -column 4, line 10 ---	1,12
A	WO 96 34968 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 7 November 1996 (1996-11-07) column 13, line 15 -column 15, line 17 -----	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/14600

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
WO 9211375	A	09-07-1992	SE 467160 B	01-06-1992			
			AU 9109791 A	22-07-1992			
			EP 0563201 A1	06-10-1993			
			PL 169859 B1	30-09-1996			
			SE 9004095 A	01-06-1992			
			WO 9211375 A1	09-07-1992			
			US 5856467 A	05-01-1999			
US 3515591	A	02-06-1970	NONE				
US 3086890	A	23-04-1963	NONE				
EP 1179298	A	13-02-2002	US 2002041923 A1	11-04-2002			
			CN 1337170 A	27-02-2002			
			EP 1179298 A2	13-02-2002			
			JP 2002095405 A	02-04-2002			
US 3128209	A	07-04-1964	NONE				
WO 9711188	A	27-03-1997	DE 19534759 A1	20-03-1997			
			DE 19547733 A1	26-06-1997			
			AU 715944 B2	10-02-2000			
			AU 7131396 A	09-04-1997			
			CA 2231774 A1	27-03-1997			
			WO 9711188 A1	27-03-1997			
			EP 0851934 A1	08-07-1998			
			HU 9900510 A2	28-05-1999			
			JP 11512286 T	26-10-1999			
			US 6207880 B1	27-03-2001			
			US 2001007155 A1	05-07-2001			
			WO 9507355	A	16-03-1995	DE 4330960 A1	16-03-1995
						WO 9507355 A1	16-03-1995
AU 694448 B2	23-07-1998						
AU 7657394 A	27-03-1995						
EP 0719338 A1	03-07-1996						
JP 9502098 T	04-03-1997						
US 6066782 A	23-05-2000						
CA 2171313 A1	16-03-1995						
HU 74667 A2	28-01-1997						
EP 108833	A	23-05-1984				EP 0108833 A1	23-05-1984
			DE 3270675 D1	22-05-1986			
US 4251556	A	17-02-1981	NONE				
WO 9634968	A	07-11-1996	AU 706009 B2	03-06-1999			
			AU 5509996 A	21-11-1996			
			CA 2217878 A1	07-11-1996			
			EP 0826061 A2	04-03-1998			
			WO 9634968 A2	07-11-1996			

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**

IPK 7 C08B30/14 A23L1/0522 A23K1/00 C09J103/02 C09D103/02  
C08L3/02

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08B

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

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

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 92 11375 A (AMYLOGENE HB) 9. Juli 1992 (1992-07-09) Seite 7, Zeile 26 - Zeile 31 Seite 8, Zeile 9 - Zeile 10 Seite 10 -Seite 11; Beispiel 2 Seite 12; Beispiel 6 Anspruch 17	1-8
X	US 3 515 591 A (JACOB R. FELDMAN) 2. Juni 1970 (1970-06-02) Spalte 2, Zeile 38 - Zeile 61 Spalte 4, Zeile 29 - Zeile 50; Beispiel 1 Ansprüche	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

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

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

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

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

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. April 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/04/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Mazet, J-F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 3 086 890 A (ANATOLE SARKO ET AL.) 23. April 1963 (1963-04-23) Spalte 1, Zeile 10 - Zeile 19 Spalte 2, Zeile 14 - Zeile 27 Spalte 3, Zeile 10 - Spalte 4, Zeile 10 Ansprüche; Beispiele ----	1-16
P,X	EP 1 179 298 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 13. Februar 2002 (2002-02-13) Seite 3, Zeile 6 - Zeile 16 Seite 3, Zeile 26 - Zeile 37 ----	1-8,10, 15
A	US 3 128 209 A (FELIX J. GEMINO ET AL.) 7. April 1964 (1964-04-07) Spalte 1, Zeile 10 - Zeile 18 Beispiele ----	1-16
A	WO 97 11188 A (PLANTEC BIOTECHNOLOGIE GMBH) 27. März 1997 (1997-03-27) in der Anmeldung erwähnt Seite 27, Zeile 12 - Seite 33, Zeile 18 ----	1-16
A	WO 95 07355 A (INSTITÜT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH) 16. März 1995 (1995-03-16) Seite 2, Zeile 5 - Zeile 7 Seite 2, Zeile 17 - Zeile 31 Ansprüche 18-20 ----	1-16
A	EP 0 108 833 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL CORPORATION) 23. Mai 1984 (1984-05-23) Beispiel III ----	1,11,16
A	US 4 251 556 A (BURKWALL JR. ET AL.) 17. Februar 1981 (1981-02-17) Spalte 3, Zeile 63 - Spalte 4, Zeile 10 ----	1,12
A	WO 96 34968 A (NATIONAL STARCH AND CHEMICAL INVESTMENT HOLDING CORPORATION) 7. November 1996 (1996-11-07) Spalte 13, Zeile 15 - Spalte 15, Zeile 17 -----	1

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/14600

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung			
WO 9211375	A	09-07-1992	SE 467160 B	01-06-1992			
			AU 9109791 A	22-07-1992			
			EP 0563201 A1	06-10-1993			
			PL 169859 B1	30-09-1996			
			SE 9004095 A	01-06-1992			
			WO 9211375 A1	09-07-1992			
			US 5856467 A	05-01-1999			
US 3515591	A	02-06-1970	KEINE				
US 3086890	A	23-04-1963	KEINE				
EP 1179298	A	13-02-2002	US 2002041923 A1	11-04-2002			
			CN 1337170 A	27-02-2002			
			EP 1179298 A2	13-02-2002			
			JP 2002095405 A	02-04-2002			
US 3128209	A	07-04-1964	KEINE				
WO 9711188	A	27-03-1997	DE 19534759 A1	20-03-1997			
			DE 19547733 A1	26-06-1997			
			AU 715944 B2	10-02-2000			
			AU 7131396 A	09-04-1997			
			CA 2231774 A1	27-03-1997			
			WO 9711188 A1	27-03-1997			
			EP 0851934 A1	08-07-1998			
			HU 9900510 A2	28-05-1999			
			JP 11512286 T	26-10-1999			
			US 6207880 B1	27-03-2001			
			US 2001007155 A1	05-07-2001			
			WO 9507355	A	16-03-1995	DE 4330960 A1	16-03-1995
						WO 9507355 A1	16-03-1995
AU 694448 B2	23-07-1998						
AU 7657394 A	27-03-1995						
EP 0719338 A1	03-07-1996						
JP 9502098 T	04-03-1997						
US 6066782 A	23-05-2000						
CA 2171313 A1	16-03-1995						
HU 74667 A2	28-01-1997						
EP 108833	A	23-05-1984				EP 0108833 A1	23-05-1984
			DE 3270675 D1	22-05-1986			
US 4251556	A	17-02-1981	KEINE				
WO 9634968	A	07-11-1996	AU 706009 B2	03-06-1999			
			AU 5509996 A	21-11-1996			
			CA 2217878 A1	07-11-1996			
			EP 0826061 A2	04-03-1998			
			WO 9634968 A2	07-11-1996			