

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: **81107416.0**

⑥ Int. Cl.³: **A 24 B 15/20**

⑱ Anmeldetag: **18.09.81**

⑳ Priorität: **13.01.81 DE 3100715**

⑦ Anmelder: **FABRIQUES DE TABAC REUNIES S.A., Quai Jeanrenaud 3 P.O. Box 11, CH-2003 Neuchâtel (CH)**

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung: **21.07.82 Patentblatt 82/29**

⑦ Erfinder: **Gaisch, Helmut, La Pistoule 23, CH-2036 Cormondrèche (CH)**
Erfinder: **Ghiste, Patrick Daniel Louis, Fbg. Philippe Suchard 26, CH-2017 Boudry (CH)**
Erfinder: **Schulthess, Dieter, Grise Pierre 4, CH-2003 Neuchâtel (CH)**

⑧ Benannte Vertragsstaaten: **BE CH DE FR GB IT LI NL**

⑦ Vertreter: **Hach, Hans Karl, Dr., Tarunstrasse 23, D-6950 Mosbach-Waldstadt (DE)**

⑤ Verfahren zur Aufbereitung von Tabak und Tabak, aufbereitet nach diesem Verfahren.

⑥ Zur Aufbereitung von Tabak werden die unlöslichen Proteine zunächst durch enzymatische Behandlung löslich gemacht, ausgelöst und dann in der Lösung durch metabolische Assimilation eliminiert. Die übrigen Lösungsbestandteile werden an den Tabak zurückgegeben.

EP 0 056 073 A1

VERFAHREN ZUR AUFBEREITUNG VON TABAK UND TABAK,
AUFBEREITET NACH DIESEM VERFAHREN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung von Tabak
5 bei dem zunächst unlösliche Proteinbestandteile und Protein-
untereinheiten durch enzymatische Behandlung in lösliche Pro-
teinfragmente zerlegt werden und dann die löslichen Bestand-
teile in Wasser gelöst werden und die gewonnene Lösung vom be-
handelten Tabak abgetrennt wird und Tabak, aufbereitet nach
10 diesem Verfahren.

Bei einem aus der US-PS 3 132 651 bekannten Verfahren, bei dem
durch Enzyme der Alterungsprozeß - sogenanntes aging - be-
schleunigt und Nikotin entfernt werden soll, werden aus dem
15 Tabak Proteinbestandteile zusammen mit löslichen Inhaltsstof-
fen des Tabaks extrahiert. Man gewinnt so einen aufbereiteten
Tabak, in dem zwar die Proteinbestandteile, die dort uner-
wünscht sind, fehlen, der aber außerdem viele seiner löslichen
Inhaltsstoffe entbehrt und damit nur noch ein kaum genießbares
20 Tabakprodukt ist.

Dem erfinderischen Verfahren liegt die Aufgabe zugrunde, einen
aufbereiteten Tabak zu erzielen, dessen Gehalt an Proteinbe-
standteilen und deren Untereinheiten erheblich reduziert ist,
25 dessen Gehalt an übrigen löslichen Bestandteilen jedoch mög-
lichst nicht reduziert ist.

Das erfinderische Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß aus
der abgetrennten Lösung durch von Mikroorganismen hervorgerufe-
30 ne, metabolische Assimilation und anschließendes Abtrennen der

Biomasse Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen eliminiert werden und daß die in der Restlösung verbleibenden Lösungsbestandteile vorbehandeltem Tabak zugesetzt werden.

5

Durch die metabolische Assimilation gelangen die unerwünschten Proteinbestandteile und deren Untereinheiten sowie niedermolekulare Stickstoffverbindungen, wie Amine, Ammoniak, Nitrat und, falls vorhanden, Nitrit in die Biomasse, während die übrigen löslichen Bestandteile, die aus dem Tabak herausgelöst wurden, im wesentlichen in der Restlösung verbleiben und dem Tabak gegebenenfalls nach Einengung der Restlösung wieder zugesetzt werden können.

15 Im grünen Tabak sind die meisten Proteinbestandteile löslich, so daß man sie ohne enzymatische Behandlung herauslösen könnte. Das empfiehlt sich aber nicht, weil dann diese Proteinbestandteile nicht mehr bei der Trocknung, dem sogenannten curing, zur Verfügung stehen, bei der sie eine wichtige Funktion übernehmen. Beim Trocknen jedoch wird ein Großteil der ursprünglich löslichen Proteinbestandteile denaturiert zu unlöslichen Proteinuntereinheiten. Diese können dann aber nach dem erfinderischen Verfahren durch die vorgesehene enzymatische Vorbehandlung größtenteils wieder löslich gemacht werden.

25

Die enzymatische Behandlung erfolgt zweckmäßig in einer Mischung aus zerkleinertem Tabak und Wasser im Gewichtsverhältnis 1 : 3 bis 1 : 12, vorzugsweise 1 : 5. Dabei kann man zerkleinerten, getrockneten, grünen Tabak oder zur Wiederaufbereitung zerkleinerte Tabakabfälle einsetzen. Wenn man den Tabak pulverisiert einsetzt, genügt ein Gewichtsverhältnis von Tabak zu Wasser von 1 : 3 bis 1 : 5. Die enzymatische Behandlung in einer Aufschlämmung ist vorteilhaft, weil dadurch eine intensive Einwirkung des Enzyms auf die Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten begünstigt wird. Wenn man dagegen ganze Tabakblätter oder Strips - das sind entrippte Tabakblätter - einsetzt, benötigt man ein Gewichtsverhältnis von Tabak zu Wasser

von 1 : 8 bis 1 : 12, vorzugsweise 1 : 10. Die optimalen Bedingungen bei enzymatischer Behandlung hinsichtlich des Tabak-Wasser-Verhältnisses, des pH-Wertes, der Lösung und der Behandlungstemperatur hängen von dem jeweils eingesetzten Enzym
5 ab. Man findet sie gegebenenfalls durch Probieren. Die optimale Behandlungstemperatur bei den meisten Enzymen liegt im Bereich zwischen 30°C (Grad Celsius) und 70°C. Viele Enzyme, auch die Proteasen, haben ein Optimum bei 37°C. Daneben gibt es aber auch Proteasen, die bei wesentlich höheren Temperaturen
10 am aktivsten sind, zum Beispiel Waschmittelenzyme. Der optimale pH-Wert liegt für viele Enzyme im Bereich zwischen pH 7,0 und pH 7,5. Eine Ausnahme bilden jedoch die sauren Proteasen, zum Beispiel Pepsin, deren pH-Optimum zwischen 1,5 und 4 liegt. Der optimale pH-Wert wird vorzugsweise mit 1 N KOH
15 (1 normale Kaliumhydroxydlösung) oder 85 %iger H₃PO₄ (Phosphorsäure) eingestellt.

Vorzugsweise wird das Enzym mit einer Konzentration eingesetzt, die so groß gewählt ist, daß bei für das eingesetzte, aktive
20 Enzym optimaler Behandlungstemperatur im Bereich zwischen 30°C und 70°C, optimalem pH-Wert und unter ständigem Umrühren ehe das Enzym 9/10 seiner ursprünglichen Aktivität verloren hat, der Gehalt des Tabaks an unlöslichen Proteinstoffen und Proteinuntereinheiten auf 20 bis 40 % (Prozent), vorzugsweise 33 %,
25 des Ausgangswertes reduziert wird.

Erreicht man bis zu dem angegebenen Enzymabbau die angestrebte Proteinreduktion nicht, dann wird zweckmäßig eine höhere Enzymkonzentration eingesetzt; erreicht man die angestrebte Protein-
30 reduktion schon ehe der angegebene Enzymabbau stattgefunden hat, dann war die Enzymkonzentration unnötig hoch angesetzt und man kann sie für spätere Chargen reduzieren. So findet man durch Probieren leicht die für das jeweils eingesetzte Enzym vorteilhafte Konzentration. Man kann bei so als optimal ermittelten
35 Enzymkonzentration die Proteinreduktion weniger weit treiben, indem man die Behandlung vorzeitig abbricht. Dann hat man aber das Enzym nicht ausgenutzt.

Als Enzyme können solche mit proteolytischer Aktivität verwendet werden; die meisten bakteriell und mycologisch gebildeten proteolytischen Enzyme sind hier geeignet. Es kann sich dabei um reine Enzyme oder um Enzymgemische handeln. Eine Auswahl
5 geeigneter Enzyme ist in TABELLE 1 am Schluß der Beschreibung angegeben.

Für die metabolische Assimilation wird zweckmäßig die abgetrennte Lösung sterilisiert und dann mit einer in ihre expo-
10 nentielle Wachstumsphase versetzten Kultur von Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Protein und Proteinuntereinheiten, hauptsächlich Aminosäuren, zu assimilieren, angeimpft wird und unter Zugabe von Zucker auf günstigen Lebensbedingungen für diese Kultur gehalten wird, bis die gelösten Protein-
15 fragmente und anderen niedermolekularen Stickstoffverbindungen zu mindestens 95 % als Aufbaustoffe für das zelleigene Protein der Mikroorganismen verbraucht sind. Dann wird die metabolische Assimilation abgebrochen durch Abtrennen der Biomasse.

20 Durch die Sterilisation und den Einsatz in exponentieller Wachstumsphase wird sichergestellt, daß die ausgewählte Kultur selektiv tätig ist und nicht durch andere Mikroorganismen ver-
seucht wird. Durch den Abbruch der metabolischen Assimilation wird sichergestellt, daß nur die erwünschten Reaktionen her-
25 vorgerufen werden.

Im Tabakrauch erwünschte Aromastoffe bilden sich beim Abbrennen des Tabaks durch Zersetzung von bestimmten Amadoriverbindungen, die ihrerseits bei der thermischen Reaktion bestimmter Amino-
30 säuren mit Zucker entstehen. Diese Aminosäuren sind in dem behandelten und mit der Restlösung versetzten Tabak unter Umständen nicht in für eine optimale Aromabildung hinreichenden Mengen vorhanden. Man könnte die Gehälter auffüllen durch
Fremdzusatz solcher Aminosäuren oder Amadoriverbindungen. Das
35 ist aber unter dem Gesichtspunkt, daß möglichst keine Fremdstoffe dem Tabak zugesetzt werden sollen, und auch unter Kosten-
gesichtspunkten ungünstig.

Die Erfindung schlägt daher vor, die in der abgetrennten Biomasse enthaltenen Proteine destruktiv zu hydrolisieren, wobei die Hydrolysebedingungen so gewählt werden, daß diejenigen Aminosäuren, wie zum Beispiel Tryptophan, die mit reduzierendem Zucker und Erhitzen (Maillard Reaktion) nicht in solche Amadoriverbindungen umsetzbar sind, die beim thermischen Zersetzen Tabakaromen freisetzen, selektiv zerstört werden, und daß dann die anderen Aminosäuren mit reduzierendem Zucker in Amadoriverbindungen, wie zum Beispiel Asparaginsäure, Leucin, Arginin, Threonin, Glutamin, Glycin und Valin, umgesetzt werden und daß die so gewonnenen Amadoriverbindungen dem vorbehandelten Tabak zugesetzt werden.

Durch die metabolische Assimilation der Mikroorganismen liegen unter Umständen größere Mengen von diesen Aminosäuren in der Biomasse vor als in der abgetrennten Lösung vorhanden waren, wodurch ohne besonderes Zutun ein wünschenswerter Gewinn an diesen für die Aromabildung wichtigen Aminosäuren erzielbar ist.

20

Das Zusetzen der in der Restlösung verbliebenen Lösungsbestandteile und/oder der aus der Biomasse separierten Aminosäuren und/oder der daraus gewonnenen Amadoriverbindungen an den vorbehandelten Tabak erfolgt vorzugsweise fein verteilt in wässrigem Milieu mit anschließender Trocknung des angereicherten, vorbehandelten Tabaks.

Wenn hier und im folgenden davon gesprochen wird, daß dem Tabak Substanzen extrahiert werden und andere Substanzen daraus wieder zugesetzt werden, dann muß das sich nicht unbedingt auf die gleiche Tabakcharge beziehen. Man kann einer ersten Tabakcharge Substanzen entziehen und die wieder zuzusetzenden Substanzen einer zweiten Tabakcharge, die vorher einer entsprechenden Extraktion unterzogen wurde, wieder zusetzen.

Mit dem erfinderischen Verfahren ist ein aufbereiteter, als Rauchprodukt geeigneter Tabak erzielbar, der gekennzeichnet ist durch einen Proteingehalt von 2 bis 10, vorzugsweise 3, Trockengewichtsprozent und einen Amadoriverbindungsgehalt von 50,1 bis 10, vorzugsweise 5,0, Trockengewichtsprozent. Bei den Amadoriverbindungen handelt es sich um diejenigen, die beim thermischen Zerfall Tabakaromen freisetzen.

Zigaretten, die aus solchem Tabak hergestellt wurden, ergaben
10 die in TABELLE 2 am Schluß der
Beschreibung angegebenen Analysewerte.

Die Erfindung wird nun anhand einiger Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

In 10 l (Liter) Wasser wurden 3,75 g (Gramm) des Enzyms
 Protease EC 3.4.24.4 mit einer Enzymaktivität von 1,0 Enzym-
 5 einheit pro mg (Milligramm) gelöst. Eine Enzymeinheit ist die-
 jenige Aktivität, die Casein bei pH 7,5 und 37°C (Grad Celsius)
 dermaßen hydrolisiert, daß pro Minute die Menge von 1 Mykromol
 Tyrosin freigesetzt wird. In diese 10 l Enzymlösung wurden
 1 kg (Kilogramm) aufzubereitende Tabakmischung (American Blend)
 10 in Form von sogenannten Strips (entrippte Blätter) eingeschlämmt.
 Diese Schlämme wurde 6 Stunden bei 37°C stehengelassen und da-
 bei gelegentlich umgerührt. Dann wurde die wässrige Phase von
 den Strips abgetrennt und danach wurden die Strips zweimal mit
 je 2,5 l Wasser von 80°C gewaschen und anschließend ausgepreßt.
 15 Die wässrige Phase, das Waschwasser und die beim Auspressen
 anfallende Flüssigkeit wurde zur Lösung vereinigt. Es ergaben
 sich insgesamt 12 l Lösung.

Der vorbehandelte Tabak, das sind die ausgepreßten Strips, wur-
 20 de in strömender Warmluft bis auf eine Restfeuchte von 18 %
 (Prozent) getrocknet und aufbewahrt. Die aufzubereitende Tabak-
 Mischung, die Lösung und der vorbehandelte Tabak wurden analy-
 tisch untersucht. Es ergaben sich dabei Analysenwerte wie in
 TABELLE 3
 25 angegeben.

Die TABELLE 3 zeigt, daß 58 Trockengewichtsprozent der in der
 aufzubereitenden, eingesetzten Tabakmischung vorhandenen Pro-
 teine abgebaut worden sind und die Abbauprodukte in die Lösung
 30 überführt wurden.

In die 12 l Lösung wurden folgende Zusätze eingegeben:

Glukose (40 g per 1,086 g $\text{NO}_3\text{-N} + \text{NH}_2/\text{NH}_3\text{-N}$) 506 g
 35 KH_2PO_4 (Kaliumhydrophosphat) (0,2 % pro Extraktmenge) . 24 g.

Die so aufbereitete Lösung wurde in einem Autoklaven bei 105°C unter Druck sterilisiert und dann druckentlastet und auf 30°C abgekühlt und in einen 20 l Fermenter überführt. Die 30°C warme, aufbereitete Lösung wurde mit 600 ml (Milliliter) einer 5 sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befindenden Kultur von *Candida utilis* NCYC 707 angeimpft. Die angeimpfte Lösung wurde 8 Stunden lang unter Belüftung und laufendem Umrühren im Fermenter belassen. Der pH-Wert wurde zunächst mit KOH (Kaliumhydroxyd) und später mit Zitronensäure 10 auf pH 5,5 stabilisiert. Dabei wurden die Proteine, Aminosäuren, Nitrate und Nitrite durch metabolische Assimilation abgebaut. Nach Ablauf der 8 Stunden wurde die Biomasse abzentrifugiert. Man erhielt 2,25 l Biomasse mit einem Feststoffgehalt von 16 %, entsprechend 360 g wasserfreier Biomasse.

15

Der durch das Zentrifugieren gewonnene Überstand - die sogenannte Restlösung - enthielt die Tabakalkaloide in der ursprünglich vorhandenen Konzentration, darüberhinaus aber nur noch Spuren an löslichen Stickstoffverbindungen. Das Gesamtvolumen der Restlösung betrug 9,75 l, die bis zur späteren 20 Weiterverwendung bei 20°C aufbewahrt wurden.

Die abfiltrierte Biomasse wurde mit 1 l 6N Salzsäure 15 Stunden in einem Rundkolben unter Rückfluß gekocht. Dabei zerfiel 25 die Biomasse und die Proteine wurden destruktiv hydrolysiert, wobei die Aminosäure Tryptophan so weitgehend zerstört wurde, daß sie analytisch nach der Hydrolyse nicht mehr nachweisbar war.

Das Hydrolysat wurde von den Rückständen der Biomasse durch
Filtrieren getrennt, wobei die überschüssige Salzsäure ent-
wich. Der Trockenrückstand, der zu einem großen Teil aus
Aminosäuren bestand, wurde mit 100 ml Wasser angerührt und
5 vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Man erhielt ein Amino-
säurengemisch mit einem Wassergehalt von etwa 50 %.

Dieses Aminosäurengemisch wurde mit NH_4OH (Ammoniumhydroxyd)
auf pH 7 eingestellt und mit 100 g Glukose versetzt und 2
10 Stunden unter Rückfluß in einem Rundkolben gekocht, wobei
sich der Rundkolben bräunte und Amadoriverbindungen gebildet
wurden. Der noch heiße Kolbeninhalt wurde mit der vorher ge-
wonnenen Restlösung ausgewaschen, so daß die löslichen Ama-
doriverbindungen in die Restlösung übergingen.

15

Die so gewonnene, nun mit Amadoriverbindungen angereicherte
Restlösung wurde auf den vorbehandelten Tabak, also die aus-
gepreßten Strips, in einer rotierenden Flavourtrommel aufge-
sprüht, wobei während des Sprühens das überschüssige Wasser
20 durch Einblasen von Warmluft abgedampft wurde.

Der so gewonnene, aufbereitete Tabak hatte beziehungsweise
entfaltete sein volles ursprüngliches Aroma und enthielt
Alkaloidstickstoff, das heißt Nikotin, in der ursprünglichen
25 Konzentration. Dagegen war der Gehalt an Proteinstickstoff
um 58 % und der Gehalt an Amin-, Ammoniak- und Nitratstick-
stoff um 90 % gegenüber den ursprünglichen Gehältern im ein-
gesetzten Tabak reduziert.

Beispiel 2 bis 22

Diese Beispiele unterscheiden sich vom Beispiel 1 nur durch die aus TABELLE 4 ersichtlichen 5 Sachverhalte.

In den Beispielen 1 bis 22 wurden als Mikroorganismen die *Candida utilis* NCYC 707 eingesetzt. Weitere Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und Proteinuntereinheiten 10 zu assimilieren, und die anstelle der *Candida utilis* NCYC 707 einsetzbar sind, sind in

TABELLE 5

angegeben.

TABELLE 1

Auswahl geeigneter Enzyme

	Protease	EC 3.4.4.16*
5	Protease	EC 3.4.24.4
	Pronase	Enzymgemisch aus <i>Streptomyces griseus</i>
	Proteinase	EC 3.4.21.14
	Trypsin	EC 3.4.21.4
	Pepsin	EC 3.4.23.1

10 *) EC = Enzymecommission

TABELLE 2

Analysenwerte

15		aufzubereitende Tabakmischung (American Blend) wie sie nach Bei- spiel 1 eingesetzt wird	nach Beispiel 1 aufbereiteter Tabak
a) Tabakanalyse:			
20	Gesamt Alkaloide	%* 1,96	1,76
	Reduzierende Substanzen	% 6,7	3,9
	Nitrat-N	% 0,25	0,03
	Amoniak-N	% 0,31	0,05
25	Gesamt-N	% 3,22	1,63
b) Analyse des Hauptstromrauchs:			
	CO	mg/cig** 16,1	9,1
	NO	mg/cig 0,31	0,03
	TPM	mg/cig 19,1	12,5
30	Nicotin	mg/cig 1,31	1,05
	HCN	mg/cig 0,243	0,030
	Aldehyde	mg/cig 1,41	1,29

*) % = Trockengewichtsprozent

**) mg/cig = Milligramm pro Zigarette

TABELLE 3
ANALYSENWERTE

		aufzubereitende Tabakmischung (American Blend) wie sie nach Bei- spiel 1 einge- setzt wird	vorbehandelter Tabak - also die ausgepreß- ten Strips	wässrige Lösung
5				
	Gesamt-N	%* 2,95	0,99	0,139
10	Amoniak-N	% 0,22	0,02	0,012
	Nitrat-N	% 0,22	0,02	0,017
	Alkaloid-N	% 0,33	0,03	0,025
	Protein-N	% 2,18	0,92	0,085
	Protein	% 13,62	5,70	0,53
15	Gesamtheit der gelösten Stoffe	% ---	---	1,61

*) % = Trockengewichtsprozent

TABELLE 4 Teil 1

Beispiel	1	2	3	4	5
<u>a) Extraktion von Proteinen aus Tabak</u>					
Strips : Wasser	1:15	1:10	1:5	1:20	1:15
5 Temperatur (°C)	37	37	37	37	50
pH	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Zeit (Stunden)	6	6	6	6	6
Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
10 Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	1
eingesetztes Enzym	EC 3.4.24.4				
<u>b) unbehandelte Lösung</u>					
15 Nitrat-N % *	0,017	0,025	0,039	0,013	0,017
Ammonium-N %	0,012	0,020	0,031	0,01	0,012
Protein-N %	0,085	0,120	0,240	0,066	0,90
<u>c) Zusatz und Fermentationsbedingungen</u>					
Glucose %	4,2	6,9	11,4	3,3	4,4
20 Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>25 d) behandelte Lösung</u>					
Nitrat-N %	0	0	0	0	0
Ammonium-N %	0	0	0	0	0
Protein-N %	0,005	0,007	0,05	0,003	0,004
Glucose %	0				
30 Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0

TABELLE 4 Teil 2

Beispiel	6	7	8	9	10
<u>a) Extraktion von Proteinen aus Tabak</u>					
Strips : Wasser	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15
5 Temperatur (°C)	65	30	37	37	37
pH	7,5	7,5	7,0	8,0	1,5
Zeit (Stunden)	6	6	6	6	6
Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
10 Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	1
eingesetztes Enzym		EC 3.4.24.4			EC 3.4.23.1
<u>b) unbehandelte Lösung</u>					
15 Nitrat-N %	0,017	0,017	0,017	0,017	0,015
Ammonium-N %	0,012	0,012	0,012	0,012	0,010
Protein-N %	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07
<u>c) Zusatz und Fermentationsbedingungen</u>					
Glucose %	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5
20 Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>25 d) behandelte Lösung</u>					
Nitrat-N %	0	0	0	0	0
Ammonium-N %	0	0	0	0	0
Protein-N %	0,003	0,003	0,003	0,003	0
Glucose %	0	0	0	0	0
30 Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0

TABELLE 4 Teil 3

Beispiel	11	12	13	14	15
<u>a) Extraktion von Proteinen aus Tabak</u>					
Strips : Wasser	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15
5 Temperatur (°C)	37	37	37	37	37
pH	4	7,5	7,5	7,5	7,5
Zeit (Stunden)	6	10	2	2	6
Enzym-Menge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	10	1
10 Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	3,75
eingesetztes Enzym	EC 3.4.23.1			EC 3.4.24.4	
<u>b) unbehandelte Lösung</u>					
15 Nitrat-N %	0,015	0,017	0,017	0,017	0,017
Ammonium-N %	0,01	0,012	0,012	0,012	0,012
Protein-N %	0,09	0,09	0,06	0,095	0,085
<u>c) Zusatz und Fermentationsbedingungen</u>					
Glucose %	4,2	4,4	3,3	4,6	4,2
20 Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>d) behandelte Lösung</u>					
25 Nitrat-N %	0	0	0	0	0
Ammonium-N %	0	0	0	0	0
Protein-N %	0,004	0,003	0	0,006	0,005
Glucose %	0	0	0	0	0
30 Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0

TABELLE 4 Teil 4

Beispiel	16	17	18	19	20
<u>a) Extraktion von Proteinen aus Tabak</u>					
Strips : Wasser	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15
5 Temperatur (°C)	37	37	37	37	37
pH	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Zeit (Stunden)	6	6	6	6	6
Enzymmenge (g/kg Tabak)	7,5	3,75	3,75	3,75	3,75
10 Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	0,5	1	1	1	1
eingesetztes Enzym		EC 3.4.24.4			
<u>b) unbehandelte Lösung</u>					
15 Nitrat-N %	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
Ammonium-N %	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
Protein-N %	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085
<u>c) Zusatz und Fermentationsbedingungen</u>					
Glucose %	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
20 Temperatur (°C)	30	25	36	30	30
pH	5,5	5,5	5,5	4,0	6,0
Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>25 d) behandelte Lösung</u>					
Nitrat-N %	0	0	0	0	0
Ammonium-N %	0	0	0	0	0
Protein-N %	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Glucose %	0	0	0	0	0
30 Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0

TABELLE 4 Teil 5

Beispiel	21	22
<u>a) Extraktion von Proteinen aus Tabak</u>		
Strips : Wasser	1:15	1:15
5 Temperatur (°C)	37	37
pH	7,5	7,5
Zeit (Stunden)	6	6
Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75
10 Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1
eingesetztes Enzym	EC 3.4.24.4	
<u>b) unbehandelte Lösung</u>		
15 Nitrat-N %	0,017	0,017
Ammonium-N %	0,012	0,012
Protein-N %	0,085	0,085
<u>c) Zusatz und Fermentationsbedingungen</u>		
Glucose %	4,2	4,2
20 Temperatur (°C)	30	30
pH	5,5	5,5
Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,5	1,0
<u>25 d) behandelte Lösung</u>		
Nitrat-N %	0	0
Ammonium-N %	0	0
Protein-N %	0,005	0,005
Glucose %	0	0
30 Kaliumhydrogen- phosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,6

*) % = Trockengewichtsprozent

TABELLE 5

Auswahl geeigneter Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und Proteinuntereinheiten zu assimilieren

5	Candida utilis	DSM 70167 = CBS 359
	Candida utilis	NCYC 707
	Candida utilis	CBS 621
	Candida utilis	NCYC 321
	Candida berthetii	CBS 5452

10

Diese Stämme sind als sogenannte Standardstämme der Öffentlichkeit zugänglich und an den durch die Abkürzungen bezeichneten Hinterlegungsstellen unter der angegebenen Nummer erhältlich.

15 Die Abkürzungen bedeuten:

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Grisebachstraße 8
D-3400 Göttingen

20

NCYC = NATIONAL COLLECTION OF YEAST CULTURES
Lyttel Hall, Surrey RH 1 4HY
Nutfield Ridge 2272, Großbritannien

25 CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures
Julianalaan 67 a
Delft / Niederlande

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Aufbereitung von Tabak, bei dem zunächst unlösliche Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten durch enzymatische Behandlung in lösliche Proteinformen zerlegt werden und dann die löslichen Bestandteile in Wasser gelöst werden und die gewonnene Lösung vom behandelten Tabak abgetrennt wird, dadurch gekennzeichnet, daß aus der abgetrennten Lösung durch von Mikroorganismen hervorgerufene, metabolische Assimilation und anschließendes Abtrennen der Biomasse Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen eliminiert werden und daß die in der Restlösung verbleibenden Lösungsbestandteile vorbehandeltem Tabak zugesetzt werden.
15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufbereitung von grünem Tabak dieser zunächst unter Denaturierung löslicher Proteinbestandteile in unlösliche Proteinuntereinheiten getrocknet wird (curing) und erst dann der enzymatischen Behandlung unterworfen wird.
20
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufbereitung von zerkleinertem, getrocknetem, grünem Tabak und zur Wiederaufbereitung von zerkleinertem Tabakabfällen aus dem Tabak und Wasser im Gewichtsverhältnis 1 : 3 bis 1 : 12, vorzugsweise 1 : 5, eine Aufschlämmung gebildet wird, die dann der enzymatischen Behandlung unterworfen wird.
25
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Behandlung mit einem Enzym mit proteolytischer Aktivität in einer Tabak-Wasser-Aufschlämmung im Gewichtsverhältnis 1 : 3 bis 1 : 12, vorzugsweise 1 : 5, und mit einer Enzymkonzentration erfolgt, die so groß gewählt ist, daß bei für das eingesetzte, aktive Enzym optimaler Behandlungstemperatur im Bereich zwischen 30°C (Grad Celsius) und 70°C, optimalem pH-Wert und unter ständigem Umrühren ehe das Enzym 9/10 seiner ursprünglichen Aktivität
30
35

verloren hat, der Gehalt des Tabaks an unlöslichen Protein-
stoffen und Proteinuntereinheiten auf 20 bis 40 % (Prozent),
vorzugsweise 33 %, des Ausgangswertes reduziert wird.

55. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß zur metabolischen Assimilation die abge-
trennte Lösung sterilisiert und dann mit einer in ihre expo-
nentielle Wachstumsphase versetzten Kultur von Mikroorganis-
men, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und Proteinunterein-
10 heiten zu assimilieren, angeimpft wird und unter Zugabe von
Zucker auf günstigen Lebensbedingungen für diese Kultur gehalten
wird, bis die gelösten Proteinfragmente und anderen nie-
dermolekularen Stickstoffverbindungen zu mindestens 95 % als
Aufbaustoffe für das zelleigene Protein der Mikroorganismen
15 verbraucht sind und daß dann die metabolische Assimilation ab-
gebrochen wird durch Abtrennen der Biomasse.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß in der abgetrennten Biomasse enthaltene
20 Proteine destruktiv hydrolisiert werden, derart, daß diejeni-
gen Aminosäuren, die mit reduzierendem Zucker und Erhitzen
(Maillard Reaktion) nicht in solche Amadoriverbindungen um-
setzbar sind, die beim thermischen Zersetzen Tabakaromen frei-
setzen, selektiv zerstört werden und daß dann die anderen
25 Aminosäuren mit reduzierendem Zucker in Amadoriverbindungen
umgesetzt werden und daß die so gewonnenen Amadoriverbindungen
dem vorbehandelten Tabak zugesetzt werden.

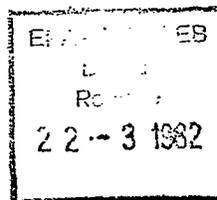
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
30 gekennzeichnet, daß das Zusetzen der in der Restlösung ver-
bliebenen Lösungsbestandteile und/oder der aus der Biomasse
separierten Aminosäuren an den vorbehandelten Tabak fein ver-
teilt erfolgt im wässrigen Milieu mit anschließender Trocknung
des angereicherten, vorbehandelten Tabaks.

8. Tabak, aufbereitet nach einem Verfahren aus einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch einen Proteingehalt von 2 bis 10, vorzugsweise 3 Trockengewichtsprozent und einen Amadoriverbindungsgehalt von 0,1 bis 10, vorzugsweise 5 5,0 Trockengewichtsprozent.

DR. HANS KARL HACH
PATENTANWALT

0056073
D-6950 MOSBACH, den 9. 03. 82
WALDSTADT - TARUNSTRASSE 23
TELEFON 3131 (VORWAHL 06261)

An das
Europäische Patentamt
Erhardtstr. 27
8000 München 2



Europäische Patentanmeldung Nr. 81107416.0

Titel: Verfahren zur Aufbereitung von Tabak und Tabak, aufbereitet nach diesem Verfahren

Anmeldedatum: 18.9.1981 Prioritätsdatum: 13.1.1981

Anmelder: FABRIQUES DE TABAC REUNIES SA.

Stichwort: Protagoras , Staaten: CH, NL, BE, GB, FR, IT, BRD

Meine Akte: P 28 263

Der Stamm CBS 359 ist falsch zitiert. Dem richtig zitierten Stamm DSM 70167 entspricht der NCYC 359. Ein Beleg für diese Entsprechung ist beigelegt. Es wird gebeten, diesen Fehler in den Akten zu korrigieren und den Fehler zu entschuldigen. Die geänderte Seite 18 ist beigelegt.

Dr. H a c h
Patentanwalt

Anlage

1. Seite 18 3-fach
2. Titelblatt DSM Katalog 1977
3. Seite 218 DSM Katalog 1977

Dem Berichtigungsantrag gem. R. 83 EPÜ wird
~~mit dem Namen des eingetragenen Erfinders~~
zustimmend.
DEN HAAG, den 23 MARCH 1982
EINGANGSSTELLE R. KRAANEN

TABELLE 5

Auswahl geeigneter Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und Proteinuntereinheiten zu assimilieren

5	Candida utilis	DSM 70167 = NCYC 359
	Candida utilis	NCYC 707
	Candida utilis	CBS 621
	Candida utilis	NCYC 321
	Candida berthetii	CBS 5452

10

Diese Stämme sind als sogenannte Standardstämme der Öffentlichkeit zugänglich und an den durch die Abkürzungen bezeichneten Hinterlegungsstellen unter der angegebenen Nummer erhältlich.

15 Die Abkürzungen bedeuten:

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Grisebachstraße 8
D-3400 Göttingen

20

NCYC = NATIONAL COLLECTION OF YEAST CULTURES
Lyttel Hall, Surrey RH 1 4HY
Nutfield Ridge 2272, Großbritannien

25 CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures
Julianalaan 67 a
Delft / Niederlande

0056073



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 81 10 7416

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
P/A	EP - A - 0 024 152 (FABRIQUES DE TABAC REUNIES S.A.) * Ansprüche 1,3,4,5 und 7 * ---	1,5	A 24 B 15/20
A	FR - A - 2 389 341 (FABRIQUES DE TABAC REUNIES S.A.) * Ansprüche 1 und 5 * ---	1	
A	US - A - 3 478 015 (ONISHI et al.) * Ansprüche 1,2,6; Spalte 1, Zeilen 46-48; Beispiel I * ---	6,8	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)
A	US - A - 3 920 026 (WARFIELD et al.) * Anspruch 1; Beispiele I, XVI * ---	6,8	A 24 B
A	LU - A - 64 076 (J.P. SCHMIDT JUN.) * Ansprüche 1,2; Seite 5, Zeilen 25-32 * -----	1,4	
			KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE
			X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument
			&: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
<p>X Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	16.02.1982	ALMOND	