



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer : **0 056 073**
B1

12

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

45 Veröffentlichungstag der Patentschrift :
07.11.84

51 Int. Cl.³ : **A 24 B 15/20**

21 Anmeldenummer : **81107416.0**

22 Anmeldetag : **18.09.81**

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

30 Priorität : **13.01.81 DE 3100715**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung :
21.07.82 Patentblatt 82/29

45 Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung : **07.11.84 Patentblatt 84/45**

84 Benannte Vertragsstaaten :
BE CH DE FR GB IT LI NL

56 Entgegenhaltungen :
EP-A- 0 024 152
FR-A- 2 389 341
LU-A- 64 076
US-A- 3 478 015
US-A- 3 920 026

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

72 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)

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

EP 0 056 073 B1

Anmerkung : Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung von Tabak, bei dem zunächst unlösliche Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen in lösliche Proteinfragmente zerlegt werden und dann die löslichen Bestandteile in Wasser gelöst werden und die gewonnene Lösung vom behandelten Tabak abgetrennt wird und Tabak, aufbereitet nach diesem Verfahren.

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

Aus LU-A 64 076 ist es bekannt, die Tabakfermentation durch Zugabe proteolytischer Enzyme zu beschleunigen oder zu verbessern. Proteine werden dabei zerkleinert aber nicht entfernt.

Aus EP-A 0 024 152 ist es bekannt, Nitrat, Nitrit und Ammoniumverbindungen aus einem Tabakextrakt zu entfernen. Dazu werden aber keine Enzyme eingesetzt. Da nur ein kleiner Teil der im getrockneten Tabak enthaltenen Proteine wasserlöslich ist, wird bei der anschließenden Extraktion nur dieser kleine Teil der Proteine aus dem Tabak entfernt.

Dem erfinderischen Verfahren liegt die Aufgabe zugrunde, einen aufbereiteten Tabak zu erzielen, dessen Gehalt an Proteinbestandteilen und deren Untereinheiten erheblich reduziert ist, dessen Gehalt an übrigen löslichen Bestandteilen jedoch möglichst nicht reduziert ist.

Das erfinderische Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß auf die abgetrennte Lösung Mikroorganismen angewendet werden, die Proteinbestandteile, Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen metabolisch assimilieren können und daß die Proteinbestandteile, Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen in die Biomasse durch die metabolische Assimilation überführt werden, daß die Biomasse von der Restlösung abgetrennt wird und daß die in der Restlösung verbleibenden Lösungsbestandteile vorbehandeltem Tabak zugesetzt werden.

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.

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.

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 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 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 5 liegt. Der optimale pH-Wert wird vorzugsweise mit 1 N KOH (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 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 %, des Ausgangswertes reduziert.

Erreicht man bis zu dem angegebenen Enzymabbau die angestrebte Proteinreduktion nicht, dann wird zweckmäßig eine höhere Enzymkonzentration eingesetzt ; erreicht man die angestrebte Proteinre-

duktion 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 Enzymkonzentrationen die Proteinreduktion weniger weit treiben, indem man die Behandlung vorzeitig abbricht. Dann hat man aber das Enzym nicht ausgenutzt.

Geeignete Enzyme mit proteolytischer Aktivität sind bekannt und werden auf dem Markt angeboten. Von den so angebotenen Enzymen wählt man vorläufig diejenigen aus, von denen bekannt ist oder vermutet werden kann, daß sie in der Lage sind, den hier geforderten Abbau zu leisten, nämlich unlösliche Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten des Tabaks in lösliche Proteinfragmente zu zerlegen. Bei dieser Vorauswahl beschränkt man sich zweckmäßig auf solche Enzyme, die zu kommerziell günstigen Bedingungen bereitgestellt sind. Aus den vorausgewählten Enzymen findet man durch Probieren solche Enzyme, die besonders gut für dieses Verfahren geeignet sind.

Eine Auswahl gut 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 exponentielle Wachstumsphase versetzten Kultur von Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und Proteinuntereinheiten zu assimilieren, angeimpft und unter Zugabe von Zucker auf günstigen Lebensbedingungen hinsichtlich Energieversorgung, Temperatur, Belüftung und pH-Wert für diese Kultur gehalten, bis die gelösten Proteinfragmente und anderen niedermolekularen Stickstoffverbindungen zu mindestens 95 % als Aufbaustoffe für das zelleigene Protein der Mikroorganismen verbraucht sind, und dann die metabolische Assimilation abgebrochen durch Abtrennen der Biomasse.

Durch die Sterilisation und den Einsatz in exponentieller Wachstumsphase wird sichergestellt, daß die ausgewählte Kultur selektiv tätig ist und nicht durch andere Mikroorganismen verseucht wird. Durch den Abbruch der metabolischen Assimilation wird sichergestellt, daß nur die erwünschten Reaktionen hervorgerufen werden.

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 0,1 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 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 Enzymeinheit pro mg (Milligramm) gelöst. Eine Enzymeinheit ist diejenige Aktivität, die Casein bei pH 7,5 und 37 °C (Grad Celsius) dermaßen hydrolisiert, daß pro Minute die Menge von 1 Mikromol Tyrosin freigesetzt wird. In diese 10 l Enzymlösung wurden 1 kg (Kilogramm) aufzubereitende Tabakmischung (American Blend) in Form von sogenannten Strips (entrippte Blätter) eingeschlämmt. Diese Schlämme wurde 6 Stunden bei 37 °C stehengelassen und dabei 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. 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, wurde in strömender Warmluft bis auf eine Restfeuchte von 18 % (Prozent) getrocknet und aufbewahrt. Die aufzubereitende Tabakmischung, die Lösung und der vorbehandelte Tabak wurden analytisch untersucht. Es ergaben sich dabei Analysewerte wie in Tabelle 3 angegeben.

Die Tabelle 3 zeigt, daß 58 Trockengewichtsprozent der in der aufzubereitenden, eingesetzten Tabakmischung vorhandenen Proteine abgebaut worden sind und Abbauprodukte in die Lösung überführt wurden.

In die 12 l Lösung wurden folgende Zusätze eingegeben :

Glukose (40 g per 1,086 g NO ₃ -N + NH ₂ /NH ₃ -N)	506 g
KH ₂ PO 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 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 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.

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 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 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 entwich. Der Trockenrückstand, der zu einem großen Teil aus Aminosäuren bestand, wurde mit 100 ml Wasser angerührt und vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Man erhielt ein Aminosäurengemisch mit einem Wassergehalt von etwa 50 %.

Dieses Aminosäurengemisch wurde mit NH₄OH (Ammoniumhydroxyd) auf pH 7 eingestellt und mit 100 g Glukose versetzt und 2 Stunden unter Rückfluß in einem Rundkolben gekocht, wobei sich der Rundkolben bräunte und Amadoriverbindungen gebildet wurden. Der noch heiße Kolbeninhalt wurde mit der vorher gewonnenen Restlösung ausgewaschen, so daß die löslichen Amadoriverbindungen in die Restlösung übergingen.

Die so gewonnene, nun mit Amadoriverbindungen angereicherte Restlösung wurde auf den vorbehandelten Tabak, also die ausgepreßten Strips, in einer rotierenden Flavourtrommel aufgesprüht, wobei während des Sprühens das überschüssige Wasser 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 Konzentration. Dagegen war der Gehalt an Proteinstickstoff um 58 % und der Gehalt an Amin-, Ammoniak- und Nitratstickstoff um 90 % gegenüber den ursprünglichen Gehältern im eingesetzten Tabak reduziert.

Beispiel 2 bis 22

Diese Beispiele unterscheiden sich vom Beispiel 1 nur durch die aus Tabelle 4 ersichtlichen 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 zu assimilieren, und die anstelle der *Candida utilis* NCYC 707 einsetzbar sind, sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 1

	Auswahl geeigneter Enzyme	
	Protease (Subtilisin)	EC 3.4.21.14*
45	Protease, neutrale	EC 3.4.24.4
	Pronase	Enzymgemisch aus <i>Streptomyces griseus</i>
	Proteinase K, alkalisch	EC 3.4.21.14
	Trypsin	EC 3.4.21.4
	Pepsin	EC 3.4.23.1

50 *) EC = Enzyme Commission

(Siehe Tabellen 2 und 3, Seite 5 f.)

0 056 073

Tabelle 2 : Analysenwerte

		aufzubereitende Tabak- mischung (American Blend) wie sie nach Beispiel 1 ein- gesetzt wird	nach Beispiel 1 aufbereiteter Tabak
5			
10	a) Tabakanalyse :		
	Gesamt Alkaloide	%* 1,96	1,76
	Reduzierende Substanzen	% 6,7	3,9
15	Nitrat-N	% 0,25	0,03
	Amoniak-N	% 0,31	0,05
	Gesamt-N	% 3,22	1,63
20	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
	Nicotin	mg/cig 1,31	1,05
25	HCN	mg/cig 0,243	0,030
	Aldehyde	mg/cig 1,41	1,29

*) % = Trockengewichtsprozent.

**) mg/cig = Milligramm pro Zigarette.

Tabelle 3 : Analysenwerte

		aufzubereitende Tabak- mischung (American Blend) wie sie nach Beispiel 1 ein- gesetzt wird	vorbehandelter Tabak — also die ausge- preßten Strips	wässrige Lösung
40				
45	Gesamt-N	%* 2,95	0,99	0,139
	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
50	Protein	% 13,62	5,70	0,53
	Gesamtheit der gelösten Stoffe	%		1,61

*) % = Trockengewichtsprozent.

(Siehe Tabelle 4, Teil 1, Seite 6 f.)

5

Tabelle 4 : Teil 1

10

Beispiel	1	2	3	4	5
a) Extraktion von Proteinen aus Tabak					
15 Strips : Wasser	1 : 15	1 : 10	1 : 5	1 : 20	1 : 15
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
20 Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	1
eingesetztes Enzym	EC 3.4.24.4				
b) unbehandelte Lösung					
Nitrat-N %*	0,017	0,025	0,039	0,013	0,017
Ammonium-N %	0,012	0,020	0,031	0,01	0,012
30 Protein-N %	0,085	0,120	0,240	0,066	0,90
c) Zusatz und Fermentationsbedingungen					
Glucose %	4,2	6,9	11,4	3,3	4,4
Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
35 pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
d) behandelte Lösung					
40 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				
45 Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0
*) % = Trockengewichtsprozent					

50

(Siehe Tabelle 4, Teil 2, Seite 7 f.)

55

60

65

5

Tabelle 4 : Teil 2

10

Beispiel	6	7	8	9	10
a) Extraktion von Proteinen aus Tabak					
15 Strips : Wasser	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15
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
20 Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	1
eingesetztes Enzym	EC 3.4.24.4				EC 3.4.23.1
b) unbehandelte Lösung					
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
c) Zusatz und Fermentationsbedingungen					
Glucose %	4,0	4,0	4,0	4,0	3,5
Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
35 pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
d) behandelte Lösung					
40 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
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0
45 *) % = Trockengewichtsprozent					

50

(Siehe Tabelle 4, Teil 3, Seite 8 f.)

55

60

65

5

Tabelle 4 : Teil 3

10

Beispiel	11	12	13	14	15
a) Extraktion von Proteinen aus Tabak					
15 Strips : Wasser	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15
Temperatur (°C)	37	30	37	37	37
pH	4	7,5	7,5	7,5	7,5
Zeit (Stunden)	6	10	2	2	6
20 Enzymmenge (g/kg Tabak)	3,75	3,75	3,75	10	1
Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	1	1	1	1	3,75
eingesetztes Enzym	EC 3.4.23.1		EC 3.4.24.4		
b) unbehandelte Lösung					
Nitrat-N %*	0,015	0,017	0,017	0,017	0,015
Ammonium-N %	0,01	0,012	0,012	0,012	0,012
30 Protein-N %	0,09	0,09	0,06	0,095	0,085
c) Zusatz und Fermentationsbedingungen					
Glucose %	4,2	4,4	3,3	4,6	4,2
Temperatur (°C)	30	30	30	30	30
35 pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
d) behandelte Lösung					
40 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
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0
45 *) % = Trockengewichtsprozent					

50

(Siehe Tabelle 4, Teil 4, Seite 9f.)

55

60

65

5

Tabelle 4 : Teil 4

10

Beispiel	16	17	18	19	20
a) Extraktion von Proteinen aus Tabak					
15 Strips : Wasser	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15	1 : 15
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
20 Enzymmenge (g/kg Tabak)	7,5	3,75	3,75	3,75	3,75
Enzym Aktivität (Einheit/mg Enzym)	0,5	1	1	1	1
eingesetztes Enzym	EC 3.4.24.4				
b) unbehandelte Lösung					
25 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
c) Zusatz und Fermentationsbedingungen					
30 Glucose %	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2
Temperatur (°C)	30	25	36	30	30
35 pH	5,5	5,5	5,5	4,0	6,0
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
d) behandelte Lösung					
40 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
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0	0	0	0	0
45 *) % = Trockengewichtsprozent					

50

(Siehe Tabelle 4, Teil 5, Seite 10 f.)

55

60

65

Tabelle 4 : Teil 5

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

40

Tabelle 5

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

	Candida utilis	DMS 70167 = NCYC 359
	Candida utilis	NCYC 707 = DSM 2361
	Candida utilis	CBS 621
50	Candida utilis	NCYC 321
	Candida berthetii	CBS 5452

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

Die Abkürzungen bedeuten :
 55 DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
 Grisebachstraße 8
 D-3400 Göttingen

60 NCYC = National Collection of Yeast Cultures
 Lyttel Hall, Surrey RH 1 4HY
 Nutfield Ridge 2272, Großbritannien

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

Ansprüche

1. Verfahren zur Aufbereitung von Tabak, bei dem zunächst unlösliche Proteinbestandteile und Proteinuntereinheiten durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen in lösliche Proteinfragmente
 5 zerlegt werden und dann die löslichen Bestandteile in Wasser gelöst werden und die gewonnene Lösung vom behandelten Tabak abgetrennt wird, dadurch gekennzeichnet, und daß auf die abgetrennte Lösung Mikroorganismen angewendet werden, die Proteinbestandteile, Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen metabolisch assimilieren können und daß die Proteinbestandteile, Proteinuntereinheiten und niedermolekulare Stickstoffverbindungen in die Biomasse durch die metaboli-
 10 sche Assimilation überführt werden, daß die Biomasse von der Restlösung abgetrennt wird und daß die in der Restlösung verbleibenden Lösungsbestandteile vorbehandeltem Tabak zugesetzt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die enzymatische Behandlung eines der nachfolgenden proteolytischen Enzyme eingesetzt wird :

15	Proteinase (Subtilisin)	EC 3.4.21.14
	Protease, neutrale	EC 3.4.24.4
	Pronase	Enzymgemisch aus <i>Streptomyces griseus</i>
	Proteinase K, alkalisch	EC 3.4.21.14
	Trypsin	EC 3.4.21.4
20	Pepsin	EC 3.4.23.1

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die metabolische Assimilation einer der nachfolgenden Mikroorganismen eingesetzt wird :

25	<i>Candida utilis</i>	DSM 70167 = NCYC 359
	<i>Candida utilis</i>	NCYC 707 = DSM 2361
	<i>Candida utilis</i>	CBS 621
	<i>Candida utilis</i>	NCYC 321
30	<i>Candida berthetii</i>	CBS 5452.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufbereitung von grünem Tabak dieser zunächst unter Denaturierung löslicher Proteinbestandteile in unlösliche Proteinuntereinheiten getrocknet wird und erst dann enzymatischen Behandlung unterworfen wird.

35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufbereitung von zerkleinertem, getrockneten, grünem Tabak und zur Wiederaufbereitung von zerkleinerten Tabakabfällen aus dem Tabak und Wasser im Gewichtsverhältnis 1 : 3 bis 1 : 12, vorzugsweise 1 : 5, eine Aufschlammung gebildet wird, die dann der enzymatischen Behandlung unterworfen wird.

40 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatische Behandlung mit einem Enzym mit proteolytischer Aktivität in einer Tabak-Wasser-Aufschlammung 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 verloren hat, der Gehalt des Tabaks an unlöslichen Proteinstoffen und Proteinuntereinheiten auf 20 bis 40 % (Prozent), vorzugsweise 33 %, des
 45 Ausgangswertes reduziert wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur metabolischen Assimilation die abgetrennte Lösung sterilisiert und dann mit einer in ihre exponentielle Wachstumsphase versetzten Kultur von Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, Proteine und
 50 Proteinuntereinheiten zu assimilieren, angeimpft wird und unter Zugabe von Zucker auf günstigen Lebensbedingungen hinsichtlich Energieversorgung, Temperatur, Belüftung und pH-Wert für diese Kultur gehalten wird, bis die gelösten Proteinfragmente und anderen niedermolekularen Stickstoffverbindungen zu mindestens 95 % als Aufbaustoffe für das zelleigene Protein der Mikroorganismen verbraucht sind und daß dann die metabolische Assimilation abgebrochen wird durch Abtrennen der
 55 Biomasse.

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

60

Claims

1. Process for the preparation of tobacco, in which initially insoluble protein components and protein subunits are decomposed into soluble protein fragments by treatment with proteolytic enzymes
 65 and then the soluble components are dissolved in water and the solution obtained is separated from the

treated tobacco, and characterised by the fact that micro-organisms are applied to the separated solution which can metabolically assimilate the protein components, protein subunits and low molecular nitrogen compounds, and that the protein components, protein subunits and low molecular nitrogen compounds are converted into the biomass by the metabolic assimilation, that the biomass is separated from the residual solution, and that the solution components remaining in the residual solution are added to the pre-treated tobacco.

2. Process in accordance with claim 1, characterised by the fact that one of the following proteolytic enzymes is employed for the enzymatic treatment :

10	Proteinase (subtilisin)	EC 3.4.21.14
	Protease, neutral	EC 3.4.24.4
	Pronase	enzyme mixture from streptomyces griseus
	Proteinase K, alkaline	EC 3.4.21.4
	Trypsin	EC 3.4.21.4
15	Pepsin	EC 3.4.23.1

3. Process in accordance with claim 1 or 2, characterised by the fact that one of the following micro-organisms is employed for the metabolic assimilation :

20	Candida utilis	DSM 70167 = NCYC 359
	Candida utilis	NCYC 707 = DSM 2361
	Candida utilis	CBS 621
	Candida utilis	NCYC 321
25	Candida berthetii	CBS 5452

4. Process in accordance with one of the afore-mentioned claims, characterised by the fact that for the preparation of green tobacco, the latter is initially dried into insoluble protein subunits with denaturing of soluble protein components, and only then submitted to the enzymatic treatment.

5. Process in accordance with one of the afore-mentioned claims, characterised by the fact that for the preparation of comminuted, dried, green tobacco and for the reprocessing of comminuted tobacco waste from tobacco and water with a weight ratio of 1 : 3 to 1 : 12, preferably 1 : 5, a suspension is formed which is then subjected to the enzymatic treatment.

6. Process in accordance with one of the afore-mentioned claims, characterised by the fact that the enzymatic treatment is carried out with an enzyme with proteolytic activity in a tobacco-water suspension with a weight ratio of 1 : 3 to 1 : 12, preferably 1 : 5, and with an enzyme concentration which is of such of size that at the optimum treatment temperature for the active enzyme employed, in the range between 30 °C (degrees Celcius) and 70 °C) with an optimum pH value and with continuous stirring, before the enzyme has lost 9/10 of its original activity, the tobacco's content of insoluble protein components and protein subunits is reduced to between 20 and 40 % (per cent), preferably 33 %, of the initial value.

7. Process in accordance with one of the afore-mentioned claims, characterised by the fact that for the metabolic assimilation the separated solution is sterilised and then inoculated with a culture of micro-organisms in an exponential growth phase which have the ability to assimilate proteins and protein subunits, and, with the addition of sugar, is kept at favourable living conditions for this culture with regard to energy supply, temperature, ventilation and pH value until the dissolved protein fragments and other low molecule nitrogen compounds have been consumed to at least 95 % as anabolic materials for the micro-organisms' own cellular protein, and that the metabolic assimilation is then discontinued by separating off the biomass.

8. Tobacco prepared in accordance with one of the processes in one of the afore-mentioned claims, characterised by a protein content of 2 to 10, preferably 3, dry weight per cent, and an Amadori compound content of 0.1 to 10.0, preferably 5.0, dry weight per cent.

Revendications

1. Procédé de traitement du tabac dans lequel les composants et unités secondaires protéiniques initialement insolubles sont décomposés en fragments protéiniques solubles par un traitement au moyen d'enzymes protéolytiques, les composants solubles étant ensuite dissous dans l'eau et la solution ainsi obtenue séparée du tabac traité, caractérisé par l'emploi, sur la solution ainsi séparée, de micro-organismes capables d'assimiler métaboliquement les composants et unités secondaires protéiniques, et les dérivés azotés de faible poids moléculaire ; par le fait que ces composants et sous-ensembles protéiniques et ces dérivés azotés de faible poids moléculaire sont transférés dans la biomasse par assimilation métabolique ; et par le fait que cette biomasse est séparée de la solution résiduelle, les composants demeurant dans la solution étant alors ajoutés au tabac préalablement traité.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par l'emploi, pour le traitement enzymatique, de

l'une des enzymes protéolytiques énumérées ci-après :

5	protéinase (subtilisine)	EC 3.4.21.14
	protéase neutre	EC 3.4.24.4
	pronase	mélange d'enzymes engendré par <i>Streptomyces griseus</i>
	protéinase K alcaline	EC 3.4.21.14
	trypsine	EC 3.4.21.4.
10	pepsine	EC 3.4.23.1

3. Procédé selon revendications 1 et 2, caractérisé par l'emploi, pour l'assimilation métabolique, de l'un des microorganismes énumérés ci-après :

15	<i>Candida utilis</i>	DSM 70167 = NCYC 359
	<i>Candida utilis</i>	NCYC 707 = DSM 2361
	<i>Candida utilis</i>	CBS 621
	<i>Candida utilis</i>	NCYC 321
	<i>Candida berthetii</i>	CBS 5452

20 4. Procédé selon l'une des revendications ci-avant, caractérisé par le fait que, lors du traitement du tabac vert, celui-ci est d'abord séché au cours de la dénaturation des composants protéiniques solubles en sous-ensembles protéiniques insolubles, et soumis seulement après cela au traitement enzymatique.

25 5. Procédé selon l'une des revendications ci-avant, caractérisé par la confection, en vue du traitement du tabac vert broyé et séché et du retraitement des déchets broyés de tabac, d'une suspension de tabac et d'eau en proportions pondérales comprises entre 1 : 3 et 1 : 12, de préférence 1 : 5, laquelle sera ensuite soumise au traitement enzymatique.

30 6. Procédé selon l'une des revendications ci-avant, caractérisé par le fait que le traitement enzymatique a lieu au moyen d'une enzyme à activité protéolytique dans une suspension de tabac et d'eau en proportions pondérables comprises entre 1 : 3 et 1 : 12, de préférence 1 : 5, et avec une concentration enzymatique suffisante pour que, à la température optimale de traitement pour l'enzyme active employée, laquelle est comprise entre 30 °C et 70 °C (degré Celsius), à la valeur optimum du pH et sous agitation constante, la teneur du tabac en substances et sous-ensembles protéiniques insolubles soit descendue à 20-40 % (pour cent), de préférence 33 %, de la valeur de départ avant que l'enzyme n'ait perdu 90 % de son activité originaire.

35 7. Procédé selon l'une des revendications ci-avant, caractérisé par le fait que, en vue de l'assimilation métabolique, la solution séparée est d'abord stérilisée, puis additionnée, au cours de la phase de croissance exponentielle de celle-ci, d'une culture de micro-organismes ayant la capacité d'assimiler les protéines et sous-ensembles protéiniques, cette solution étant ensuite additionnée de sucre et maintenue, en ce qui concerne l'alimentation en énergie, la température, la ventilation et la valeur du pH, dans des conditions favorables à la vie de cette culture jusqu'à ce que les fragments protéiniques dissous et autres composés azotés de faible poids moléculaire aient été consommés jusqu'à représenter au moins 95 % des substances constitutives des protéines cellulaires propres de ces micro-organismes, l'assimilation métabolique étant alors interrompue par scission de la biomasse.

40 8. Tabac, traité selon un procédé décrit dans les revendications ci-avant et caractérisé par une teneur en protéines de 2 à 10 % et de préférence 3 % de son poids à sec, et par un contenu en composés Amadori de 0,1 à 10 % et de préférence 5,0 % de son poids à sec.

50

55

60

65