

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 630**

51 Int. Cl.:

A24B 15/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2003 E 03723306 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1504679**

54 Título: **Microorganismo que reduce la cantidad de nitrosamina y método para reducir la cantidad de nitrosamina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

10.05.2002 JP 2002135777

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.04.2013

73 Titular/es:

**JAPAN TOBACCO INC. (100.0%)
2-1, TORANOMON 2-CHOME, MINATO-KU
TOKYO 105-8422, JP**

72 Inventor/es:

**KOGA, KAZUHARU y
KATSUYA, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 399 630 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismo que reduce la cantidad de nitrosamina y método para reducir la cantidad de nitrosamina usando el microorganismo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo que degrada nitrosaminas formadas en hojas de tabaco durante los procesos de conservación y almacenamiento de las hojas de tabaco, y un método para reducir nitrosaminas formadas en las hojas de tabaco durante el proceso de curado y/o proceso de almacenamiento de las mismas, usando el microorganismo.

10

Antecedentes de la técnica

Las nitrosaminas contenidas en hojas de tabaco (nitrosaminas específicas de tabaco, que se denominarán "TSNA" en lo sucesivo en este documento), no están presentes en las hojas de tabaco inmediatamente después de la cosecha (es decir, hojas verdes), sino que se forman durante el proceso de curado y proceso de almacenamiento a continuación por una reacción entre alcaloides y nitrito contenidos en las hojas de tabaco. Este nitrito se forma por un microorganismo que está presente en la superficie de la hoja de tabaco y que tiene la capacidad para reducir nitrato.

15

20

Las TSNA principales formadas en el proceso de curado y el proceso de almacenamiento posterior son N'-nitrosornicotina (que se denominará "NNN" en lo sucesivo en este documento), 4-(N-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (que se denominará "NNK" en lo sucesivo en este documento), N'-nitrosoanatabina (que se denominará "NAT" en lo sucesivo en este documento), N'-nitrosoanabasina (que se denominará "NAB" en lo sucesivo en este documento) y similares.

25

Los ejemplos del método que se ha conocido convencionalmente como un método para reducir el contenido de TSNA en hojas de tabaco incluyen: (1) un método para suprimir la formación de TSNA; y (2) un método para retirar TSNA que se ha formado.

30

Los ejemplos del método para suprimir la formación de TSNA incluyen: un método para reducir el contenido de alcaloides en hojas de tabaco reduciendo la cantidad de fertilizante nitrogenado; un método para reducir TSNA formada durante el proceso de curado, adoptando un tipo de secadero con calentamiento indirecto en lugar de tipo de secadero con calentamiento directo (este método se emplea principalmente para tabaco curado al aire caliente); un método para cultivar una nueva variedad de tabaco que tenga menos contenido en alcaloides, basándose dicho método en el progreso de la tecnología de cultivo; y similares.

35

Además, se ha presentado recientemente un método en el que la formación de TSNA se suprime por irradiación con microondas (Publicación Nacional de PCT N° 2001-503247). Sin embargo, dicho secado y curado rápido provocado por el tratamiento anteriormente mencionado con microondas da como resultado un cambio insuficiente en el tipo de componentes de las hojas de tabaco, cambio que se efectuaría de forma satisfactoria en el proceso de curado convencional. Por lo tanto, las hojas de tabaco resultantes que se han curado más rápidamente que por el método convencional muestran escaso aroma y sabor cuando se fuman.

40

45

En el caso del método de retirada de TSNA (formada de este modo) de las hojas de tabaco, el número de ejemplos presentados del mismo es menor que con el método de suprimir la formación de TSNA. Como uno de estos ejemplos, se conoce un método en el que se retira TSNA de las hojas de tabaco por extracción supercrítica (documento WO 01/65954). Sin embargo, este método no se ha aplicado al uso práctico por causa de los costes del mismo.

50

Debido a las circunstancias anteriormente descritas, hay una demanda de nuevos métodos para reducir el contenido de TSNA que se sabe que se forman durante los procesos de curado y almacenamiento de las hojas de tabaco.

55

Además, hay una demanda de hojas de tabaco, como la materia prima de los cigarrillos, que tengan relativamente menor contenido de TSNA y mantengan un buen aroma y sabor satisfactorios para los consumidores.

En consecuencia, el objeto de la presente invención es proporcionar un método que permita reducir el contenido de TSNA formadas durante los procesos de curado y almacenamiento convencionales.

60

Adicionalmente, ya se sabe que un microorganismo que pertenezca al género *Aspergillus*, que es un hongo filamentoso aislado de fuente de soja no refinada, degrada nitrosaminas (Publicación de Solicitud de Patente Japonesa N° 10-276681). Sin embargo, se ha indicado que los microorganismos que pertenecen al género *Aspergillus* necesitan alto contenido de humedad para su supervivencia, pudiendo provocar dicho alto contenido en humedad efectos adversos en la calidad de las hojas de tabaco, especialmente en el sabor y aroma de las mismas. Por lo tanto, el uso de dicho microorganismo como se ha descrito anteriormente en el tratamiento de hojas de tabaco

65

puede provocar un problema en la calidad del tabaco.

El documento US-A-4 556 073 describe un método para el tratamiento del tabaco con microorganismos para reducir el contenido de nitrato del tabaco. Estos microorganismos preferidos son, *Micrococcus denitrificans* y, como realización alternativa, *Pseudomonas fluorescens*.

Tobacco International, vol. 188, Nº 18, 1986, páginas 48-51 describe que los desnitrificantes tales como *Pseudomonas fluorescens* son eficaces en la retirada de NO_3^- y NO_2^- en condiciones experimentales y sugiere que tales desnitrificantes podrían ser eficaces en la retirada tanto de NO_3^- como de NO_2^- en el tabaco.

Divulgación de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir el contenido de TSNA en hojas de tabaco, caracterizado por comprender tratamiento de hojas de tabaco con un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Sphingomonas paucimobilis* cepa LG5 y *Pseudomonas fluorescens* cepa LG38.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un *Sphingomonas paucimobilis* cepa LG5 (FERM BP-7830) que es capaz de reducir el contenido de TSNA en hojas de tabaco.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un *Pseudomonas fluorescens* cepa LG38 (FERM BP-7831) que es capaz de reducir el contenido de TSNA en hojas de tabaco.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Como resultado del estudio y análisis del proceso de formación de TSNA durante el curado y almacenamiento de hojas de tabaco, los inventores de la presente invención han descubierto que existe un microorganismo que puede degradar TSNA, entre los microorganismos presentes en la hoja de tabaco, completando de este modo la presente invención.

Mientras los inventores de la presente invención analizaban el proceso de formación de TSNA en hojas de tabaco que se estaban curando, aislaron un microorganismo que puede degradar las TSNA formadas, de los microorganismos presentes en las hojas de tabaco. Además, los inventores de la presente invención descubrieron que el contenido de TSNA en las hojas de tabaco puede reducirse tratando, con el microorganismo, las hojas de tabaco que se están curando y/o las hojas de tabaco que van a almacenarse después del proceso de curado.

Los dos tipos de microorganismos que muestran actividad de degradación especialmente alta entre los microorganismos aislados (recogidos) se han identificado basándose en las características bacteriológicas de los mismos, como *Sphingomonas paucimobilis* y *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente. Los inventores de la presente invención nombraron la cepa de *Sphingomonas paucimobilis* "LG5" (que se denominará "LG5" o "cepa LG5" en lo sucesivo en este documento) y la cepa de *Pseudomonas fluorescens* "LG38" (que se denominará "LG38" o "cepa LG38" en lo sucesivo en el este documento). LG5 se ha depositado con el número de acceso FERM BP-7830 y LG38 se ha depositado con el número de acceso FERM BP-7831, respectivamente, el 18 de diciembre de 2001, en el Depositario de Organismos de Patente Internacional (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (AIST Tsukuba Central 6, 1-1 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón).

Estos microorganismos LG5 y LG38 reducen eficazmente TSNA en hojas de tabaco sin provocar ningún efecto adverso en la calidad de las hojas de tabaco que se están curando y/o las hojas de tabaco en almacenamiento.

Además, de acuerdo con el método de la presente invención, puede conseguirse reducción del contenido de TSNA simplemente tratando la hoja de tabaco con el microorganismo, sin cambiar el método convencional de curado. Por lo tanto, la calidad, aroma y sabor de la presente hoja de tabaco puede mantenerse de forma fiable.

La actividad de las cepas LG5 y LG38 son las siguientes.

LG5 tiene la actividad de degradar específicamente NNK. LG38 tiene la actividad de degradar NNN, NNK, NAT y NAB.

La hoja de tabaco para tratar de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier tabaco, siempre que el tabaco permita la operación de curado convencional. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen tabaco Burley y tabaco doméstico japonés como un tabaco de tipo curado al aire y curado al aire caliente que se cura con un aparato, sin restricción a los mismos.

El tiempo que se trata la hoja de tabaco con el microorganismo de acuerdo con la presente invención no está particularmente restringido, y el tratamiento puede llevarse a cabo en cualquier momento en un periodo desde el momento inmediatamente antes de que se forme TSNA en la hoja de tabaco al momento en el que se procesa la

5 hoja de tabaco en cigarrillos. El tratamiento se lleva a cabo preferentemente, en un periodo durante el cual la hoja de tabaco se cura y/o un periodo durante el cual la hoja de tabaco se almacena. En un caso en el que el tratamiento se lleve a cabo en el proceso de curado, el tratamiento se lleva a cabo preferentemente en un periodo desde el momento inmediatamente posterior a la cosecha, que es el momento antes de que se forme TSNA, al momento del estadio de amarilleo y estadio de pardeamiento. Sin embargo, el tratamiento puede llevarse a cabo en cualquier momento en el proceso de curado. En un caso en el que el tratamiento se lleva a cabo en el proceso de almacenamiento, el tratamiento se lleva a cabo preferentemente cuando el almacenamiento comienza después del proceso de curado, aunque el tratamiento puede llevarse a cabo en cualquier momento durante el periodo de almacenamiento. El momento en el que el tratamiento se lleva a cabo puede seleccionarse básicamente por un operador, según se desee, en un periodo desde el momento en el que se inicia el proceso de curado hasta el momento en el que se completa el proceso de almacenamiento.

15 Como alternativa, es aceptable que la hoja de tabaco se trate con el microorganismo en el campo inmediatamente antes de la cosecha y después se coseche y se cure.

El número de veces del tratamiento con el microorganismo de acuerdo con la presente invención no está limitado a una vez. El tratamiento puede llevarse a cabo múltiples veces consecutivamente en el periodo de tratamiento, con un intervalo predeterminado entre cada tratamiento.

20 El tratamiento de la presente invención no está limitado al tratamiento durante los procesos de curado y/o almacenamiento, y el tratamiento puede llevarse a cabo en un proceso durante el que la hoja de tabaco se procesa en cigarrillos.

25 El tratamiento de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos conocidos. Los ejemplos de los mismos incluyen pulverización de la suspensión en la que se suspende el microorganismo y revestimiento de polvo que contiene células bacterianas del microorganismo. Es decir, un operador puede seleccionar un método apropiado para tratamiento. También es aceptable sumergir la hoja de tabaco en un líquido que contenga el microorganismo.

30 Como se ha descrito anteriormente, los microorganismos que se usan en la presente invención son cepa LG5 y cepa LG38.

35 En la presente memoria descriptiva, la expresión "reducir TSNA" representa reducir el contenido de TSNA en la hoja de tabaco. Por ejemplo, degradar cada uno de los componentes de TSNA en la hoja de tabaco formados durante los procesos de curado y almacenamiento de la misma está incluido en la expresión "reducir TSNA".

Como medio de cultivo para cultivar el microorganismo usado en la presente invención, pueden usarse diversos tipos de medio de cultivo conocidos para cultivo de microorganismos.

40 Con respecto a las condiciones de cultivo en las que el microorganismo se cultiva, la temperatura puede estar en un intervalo de 25 a 35 °C, preferentemente en un intervalo de 28 a 32 °C, y el pH puede estar en un intervalo de 6,0 a 8,0, preferentemente 7,0 aproximadamente.

45 En la presente invención, el microorganismo se recoge por centrifugado, después de cultivarse durante un periodo predeterminado. Las células bacterianas recogidas pueden usarse después de suspenderse de un tampón. Como alternativa, las células bacterianas recogidas pueden usarse en forma de polvo por liofilización.

50 En un caso en el que las células bacterianas recogidas se suspenden en un tampón específico para preparar la suspensión del microorganismo, puede usarse agua destilada esterilizada, tampón fosfato o similares como el tampón.

55 La concentración de las células bacterianas suspendidas en un tampón puede ser de 10^7 a 10^{12} , preferentemente 10^8 a 10^{10} células por 1 ml del tampón. Es preferible que las células bacterianas se suspendan en una concentración tal como se ha descrito anteriormente cuando se usen para el tratamiento de hoja de tabaco con el microorganismo.

De acuerdo con la presente invención, el tratamiento de la hoja de tabaco con el microorganismo puede llevarse a cabo usando las células bacterianas obtenidas como se ha descrito anteriormente.

60 Se prepara una solución de inoculación del microorganismo para inocular en la hoja de tabaco añadiendo agua destilada esterilizada a la suspensión bacteriana que contiene la cantidad necesaria de las células bacterianas. La solución de inoculación preparada de este modo se pulveriza uniformemente en la hoja de tabaco. Este tratamiento puede llevarse a cabo en cualquier momento dentro del periodo desde el proceso de curado hasta el proceso de almacenamiento. En el caso de usar tabaco curado al aire, el tratamiento puede llevarse a cabo en cualquier momento durante el proceso de curado y el periodo de almacenamiento posterior. En el caso de usar tabaco curado al aire caliente, el tratamiento se lleva a cabo en el estadio inicial del proceso de curado (el estadio de amarilleo) o en el proceso de almacenamiento después del proceso de curado. Es preferible que el tratamiento se lleve a cabo

en el estadio de amarilleo en el proceso de curado. En el caso de tabaco curado al aire, es preferible que el tratamiento se lleve a cabo en el estado de pardeamiento en el proceso de curado.

5 Con respecto a la cantidad de la solución de inoculación para pulverizar, cuando el tratamiento se lleva a cabo inmediatamente después de la cosecha o en el estadio inicial del proceso de curado, se aplican de 2 a 10 ml de la solución de inoculación por una hoja de tabaco. Cuando el tratamiento se lleva a cabo en un estadio intermedio del proceso de curado o a continuación, se aplican de 0,5 a 3 ml de la solución de inoculación por una hoja de tabaco.

10 Con respecto al número de veces del tratamiento, es suficiente que el tratamiento se lleve a cabo al menos una vez durante los procesos de curado y/o almacenamiento. Es preferible que el tratamiento se lleve a cabo de dos a tres veces durante los procesos de curado y/o almacenamiento, con un intervalo entre cada tratamiento.

15 De acuerdo con los aspectos de la presente invención, no se producen cambios significativos en las condiciones de curado excepto que la hoja de tabaco se trata con el microorganismo, y por lo tanto es posible reducir el contenido de TSNA sin provocar un efecto adverso en el aroma y sabor naturales de la hoja de tabaco. Ejemplos

Ejemplo 1

20 1) Aislamiento del microorganismo de las hojas de tabaco

Se recogieron microorganismos de las hojas de tabaco cultivadas en un campo de tabaco en Oyama-shi, prefectura de Tochigi.

25 Los microorganismos se recogieron tres veces, es decir, inmediatamente después de la recogida de las hojas de tabaco, el día 3 en el periodo de curado (es decir, cuando se había completado el cambio de color de las hojas a amarillo) y el día 8 en el periodo de curado (es decir, cuando se había completado el cambio de color de las hojas a marrón).

30 Se recogió la posición del peciolo de la hoja de Michinoku 1, que es tabaco Burley, y se cortaron partes del limbo de las hojas de tabaco recogidas como muestras. Las muestras obtenidas de este modo se cortaron de forma fina en cuadrados de 5 mm x 5 mm. Se pusieron aproximadamente 10 g de las muestras cortadas de este modo en un matraz de Erlenmeyer de 300 ml. Se añadieron 200 ml de tampón fosfato 10 mM (pH: 7,0) al mismo, y la mezcla se homogeneizó. La suspensión obtenida de este modo se usó como "la suspensión del momento de la cosecha" que contenía microorganismos derivados de hojas de tabaco en un momento de la cosecha.

35 Se llevó a cabo la recogida de microorganismos de hojas de tabaco en el periodo de curado (es decir, recogida el día 3 en el proceso de curado cuando se completó el cambio a color amarillo; y recogida el día 8 en el proceso de curado cuando se completó el cambio a color marrón), usando las hojas de tabaco que se habían recogido como se ha descrito anteriormente y se habían llevado después al proceso de curado, de forma similar a la de la recogida de microorganismos en el estadio de cosecha. Específicamente, la posición de peciolo de la hoja de Michinoku 1 recogida como se ha descrito anteriormente se colgó en una estructura de tubos de acero, que es un secadero convencional para tabaco curado al aire. El día 3 y el día 8 a continuación, se cortaron partes del limbo de las hojas de tabaco que se estaban curando de este modo como muestras. Las muestras obtenidas de este modo se cortaron de forma fina en cuadrados de 5 mm x 5 mm. Se recogieron aproximadamente 10 g de las muestras cortadas de este modo y se pusieron en un matraz de Erlenmeyer de 300 ml. Se añadieron 200 ml de tampón fosfato 10 mM (pH: 7,0) al mismo, y la mezcla se homogeneizó. Las suspensiones obtenidas de este modo se usaron como "las suspensiones del momento de curado" que contenían microorganismos derivados de hojas de tabaco en el periodo de curado.

50 En cada una de las tres recogidas de momentos diferentes, las hojas de tabaco recogidas se homogenizaron en un periodo de 2 horas desde la toma de muestras.

55 La suspensión del momento de la cosecha y la suspensión del momento de curado se diluyeron con el tampón de fosfato anteriormente mencionado, a una concentración a la que puede aislarse el microorganismo (específicamente, 10^2 a 10^5 veces), respectivamente. Cada una de las suspensiones diluidas obtenidas de este modo se aplicó, dejando caer 0,1 ml cada vez, en una placa YG (la composición del medio de cultivo fue como sigue: 1,0 g de extracto de levadura, 1,0 g de glucosa; 0,3 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15,0 g de agar; y una cantidad ajustada de agua destilada para hacer el volumen total del medio de cultivo 1000 ml, pH 6,8). El microorganismo aplicado de este modo se cultivó a 30 °C durante 7 días. Después del cultivo, la colonia cultivada se separó en una colonia única usando una placa YG nueva. El microorganismo aislado de este modo se almacenó a -80 °C hasta que se usó para experimentos.

60 Del modo que se ha descrito anteriormente, se aislaron 87 cepas de microorganismos de las hojas de tabaco del momento de cosecha y se aislaron 176 cepas de microorganismo de las hojas de tabaco que están en el estadio de pardeamiento. Se seleccionaron las cepas que tenían morfología de colonia diferente de estas cepas recogidas y se usaron para los experimentos a continuación.

2) Selección primaria de microorganismo degradante de TSNA

Entre las cepas derivadas de hojas de tabaco recogidas de este modo en 1), 51 cepas en total incluyendo 14 cepas recogidas de hojas de tabaco en el estadio de cosecha y 37 cepas recogidas de hoja de tabaco en el estadio de curado se seleccionaron como las cepas candidatas para selección primaria.

a) Selección del medio de cultivo

Se examinó un medio de cultivo para seleccionar el microorganismo degradante de TSNA. Usando las cepas seleccionadas en el 1) anteriormente mencionado, se examinó el crecimiento de cada cepa en un medio de cultivo que contenía NNN, NNK, NAT y NAB. Como resultado, el mejor resultado se obtuvo cuando se usó caldo TS 1/10 como el medio basal. En consecuencia, se usó caldo TS 1/10 como el medio basal en el cultivo posterior. La composición de caldo TS 1/10 en sí mismo y la composición del medio de cultivo que contiene caldo TS 1/10 y el microorganismo, que se usó para cultivo, se muestran posteriormente en este orden.

[caldo TS 1/10]

- Volumen final ajustado a 1000 ml añadiendo agua destilada
- Caseína 1,7 g
- D-glucosa 0,25 g
- NaCl 0,5 g
- K₂HPO₄ 2,5 g
- Soja tréptica 1/10 (fabricada por Difco Co., Ltd., caldo de soja tréptico Bacto; medio de digestión de caseína de soja) [Medio de cultivo para seleccionar microorganismos que degradan TSNA]
- Volumen final 35 ml
- Caldo TS 1/10 (que contiene 5 ppm de NNN, 5 ppm de NAT, 5 ppm de NAB y 5 ppm de NNK) 30 ml
- Suspensión de microorganismo para inoculación 5 ml

El medio de cultivo anteriormente mencionado para seleccionar microorganismos degradantes de TSNA se preparó por el siguiente método. Se pusieron 150 µl de diclorometano que contenía 1000 ppm de NNN, 150 µl de diclorometano que contenía 1000 ppm de NAT, 150 µl de diclorometano que contenía 1000 ppm de NAB y 150 µl de diclorometano que contenía 1000 ppm de NNK, en un matraz de Erlenmeyer y después se volatilizó completamente el diclorometano en el matraz. A continuación, se añadió el caldo TS 1/10 al matraz de modo que las concentraciones de NNN, NAT, NAB y NNK se ajustaran a 5 ppm/10 ml, respectivamente. Después de que se disolvieran NNN, NAT, NAB y NNK, se pusieron 30 ml de la mezcla en cada uno de los matraces de Erlenmeyer de 50 ml. A continuación, se añadieron 5 ml de la suspensión del microorganismo para inoculación al matraz de Erlenmeyer de 50 ml, por lo que se obtuvo un medio de cultivo para seleccionar microorganismos degradantes de TSNA, que tenía un volumen final de 35 ml. El medio de cultivo se incubó a 30 °C durante 24 horas con agitación.

b) Selección primaria del microorganismo degradante de TSNA

La selección primaria del microorganismo degradante de TSNA se llevó a cabo usando el medio de cultivo para selección preparado de este modo.

Las cepas candidatas para selección primaria se cultivaron cada una con agitación en el caldo TS 1/10 y después se recogieron las células bacterianas de cada cepa por centrifugación. Las células bacterianas recogidas de este modo se lavaron con agua destilada esterilizada dos veces y se suspendieron en agua destilada esterilizada. A continuación, la concentración del microorganismo en cada suspensión se ajustó a 10⁸ a 10¹⁰ ufc/ml con agua destilada esterilizada, por lo que se preparó una suspensión de cada cepa candidata.

Se mezclaron entre sí de cinco a 10 cepas del microorganismo candidato en una forma de suspensión obtenida de este modo, en la que las 5 a 10 cepas mezcladas derivan del mismo estadio de las hojas de tabaco. De este modo se prepararon 7 grupos de mezclas de suspensión de los microorganismos candidatos.

Estos 7 grupos de mezclas de suspensión de los microorganismos candidatos se cultivaron de una manera similar a la 1) anteriormente mencionada usando el caldo TS 1/10 como el medio de cultivo para seleccionar microorganismos degradantes de TSNA, excepto que se emplearon los 7 grupos anteriormente descritos de mezclas de suspensión de los microorganismos candidatos.

Como el control, se añadieron 5 ml de agua destilada esterilizada en lugar de la suspensión de los microorganismos candidatos.

Los 7 grupos de suspensión de los microorganismos candidatos mezclados y el grupo de control se incubaron a 30 °C durante 24 horas con agitación.

A continuación, se determinaron los contenidos de las TSNA respectivas.

La determinación de los contenidos de las TSNA respectivas se llevó a cabo por el siguiente método. Específicamente, se determinaron los contenidos de cada uno de NNN, NAT, NAB y NNK contenidos en una muestra obtenida de cada medio de cultivo usando cromatografía de gases de acuerdo con el método mejorado de Spiegelhalter (Spiegelhalter B., Kubacki S. y Fischer S. (1989) Beitr. Tabakforsch. Int., 14 (3), 135-143, Fischer S. y Spiegelhalter B. (1989) Beitr. Tabakforsch. Int., 14(3), 145-153).

En primer lugar, cada medio de cultivo se purificó usando cromatografía en columna como sigue. En primer lugar, el medio de cultivo completo se filtró usando un papel de filtro (ADVANTEC, Nº 5). A continuación, se aplicaron 10 ml de cada filtrado en una columna cargada con Kieselgur (diámetro de partícula: 60 a 160 mm, fabricado por MERCK Co., Ltd.) y ácido ascórbico. Se recogió una fracción necesaria para una muestra disolviendo la fracción con diclorometano. La fracción obtenida de este modo se usó como una muestra para cromatografía de gases. La muestra obtenida de este modo se analizó usando cromatografía de gases HP 6890 (fabricada por Hewlett-Packard Co., Ltd.) equipada con columna DB-17 (fabricada por J & W Co. Ltd.) y detector TEA-543 (fabricado por Thermedics Co., Ltd.).

Los resultados de la determinación de los contenidos de las TSNA respectivas en los 7 grupos anteriormente descritos y el grupo de control se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Resultados de la selección primaria

Grupo	NNN		NAT		NAB		NNK		TSNA Total	
	µg/ 10 ml	(%)	µg/ 10 ml	(%)	µg/ 10 ml	(%)	µg/ 10 ml	(%)	µg/ 10 ml	(%)
1	1,34	48,13	2,40	51,95	2,04	51,54	1,37	38,29	7,16	47,87
2	1,96	70,26	3,03	65,39	2,96	74,62	1,77	49,48	9,71	64,95
3	2,16	77,59	3,76	81,33	2,92	73,56	2,48	69,50	11,32	75,75
4	1,89	67,98	4,27	92,26	3,98	100,26	2,81	78,71	12,95	86,62
5	2,92	104,71	4,07	87,97	3,72	93,68	2,99	83,64	13,69	91,57
6	2,43	87,25	4,36	94,13	3,86	97,19	2,76	77,34	13,40	89,65
7	2,33	83,46	3,71	80,12	2,97	74,77	2,38	66,71	11,38	76,12
Grupo de control	2,79		4,63		3,97		3,57		14,95	

El grupo 1 y grupo 2 de la Tabla 1 representan cada uno la mezcla de suspensión de las cepas recogidas de hojas de tabaco inmediatamente después de la cosecha. El grupo 3, grupo 4 y grupo 5 representan cada uno una mezcla de suspensión de las cepas recogidas de hojas de tabaco en el estadio de amarilleo que es el estadio inicial del proceso de curado (el día 3 del proceso de curado). El grupo 6 y grupo 7 representan cada uno la mezcla de suspensión de las cepas recogidas de hojas de tabaco en el estadio de pardeamiento (el día 8 del proceso de curado). En la Tabla, “%” representa el contenido (%) de las TSNA respectivas en cada grupo, cuando los contenidos correspondientes en el grupo de control se expresan como el 100%.

Como resulta obvio a partir de la Tabla 1, en todos los grupos de la mezcla de microorganismos, los contenidos de TSNA se redujeron en comparación con los contenidos de TSNA del grupo de control. Con respecto a la cantidad total de TSNA, en particular, la cantidad total de TSNA del grupo 1 y la del grupo 2 se redujo al 47,87% y 64,95%, respectivamente, en comparación con la del grupo de control (Tabla 1).

A partir de estos resultados, se demostró que se han aislado con éxito múltiples tipos de microorganismos útiles que degradan TSNA de hojas de tabaco.

3) Selección secundaria del microorganismo degradante de TSNA

Basándose en los resultados del 2) anteriormente mencionado, el grupo 1 y grupo 2 que mostraron excelente capacidad para degradar TSNA se sometieron adicionalmente a un ensayo con respecto a selección secundaria.

Para cada una de las 14 cepas de los microorganismos contenidos en el grupo 1 y grupo 2, se ensayó la capacidad para degradar la TSNA respectiva de los mismos.

Se ensayó la capacidad para degradar las TSNA respectivas, de cada una de las 14 cepas, de una manera similar a la descrita en el 2) anteriormente mencionado, excepto que el número del tipo de microorganismo contenido en cada

ES 2 399 630 T3

suspensión de microorganismo (habiéndose mezclado cada suspensión con el caldo TS 1/10) se limitó a una cepa seleccionada de las cepas de los microorganismos recogidos en el 1) anteriormente mencionado.

Cada uno de los valores de contenido determinados fue la media de los valores obtenidos por dos determinaciones repetidas.

5

Los resultados obtenidos de este modo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Capacidad de cada cepa para degradar TSNA

Cepa ensayada	μg/10 ml					(%)					Nº de Grupo
	NNN	NAT	NAB	NNK	TSNA	NNN	NAT	NAB	NNK	TSNA	
No añadido	2,21	2,61	1,95	2,10	8,87						
LG1	3,23	3,69	2,72	2,62	12,27	146,35	141,24	139,50	125,21	138,34	1
LG2	2,32	2,48	1,84	1,43	8,06	104,75	94,79	94,59	68,01	90,90	2
LG3	2,28	2,90	2,15	2,10	9,43	102,98	110,96	110,63	100,39	106,40	2
LG5	2,56	3,10	2,28	0,07	8,01	116,05	118,57	117,09	3,24	90,36	2
LG9	2,33	3,27	2,37	2,06	10,02	105,42	125,00	121,54	98,09	113,00	2
LG38	1,49	1,97	1,30	1,27	6,03	67,43	75,40	66,66	60,63	68,00	1
LG43	1,92	2,61	1,64	1,22	7,39	86,65	99,98	84,43	58,32	83,40	2
LG44	1,76	3,02	1,89	1,85	8,52	79,66	115,54	97,07	88,51	96,15	2
LG48	1,88	2,21	1,60	1,63	7,33	85,28	84,53	82,22	78,02	82,67	2
LG51	2,08	2,30	1,69	1,25	7,32	94,02	87,90	86,71	59,86	82,54	2
LG52	2,67	3,45	2,58	2,41	11,12	120,98	132,18	132,60	115,07	125,44	2
LG64	3,92	4,08	2,90	3,28	14,16	177,18	156,02	148,71	156,32	159,79	1
LG77	2,89	3,12	2,24	0,97	9,21	130,73	119,43	114,84	46,15	103,92	1
LG81	2,91	3,48	2,48	2,86	11,73	131,53	133,36	127,47	136,44	132,34	1

10 Como resulta obvio a partir de la Tabla 2, la cepa LG38, cepa LG48, cepa LG51 y cepa LG43 son capaces de degradar NNN, NAT, NAB y NNK. La cepa LG38 en particular, redujo NNN, NAT, NAB y NNK al 67,43%, 75,40%, 66,66% y 60,63%, respectivamente. La cepa LG38 redujo el contenido de TSNA total al 68,00%.

Además, la cepa LG2, cepa LG5 y cepa LG77 son capaces de degradar específicamente NNK. La cepa LG5, en particular, es capaz de reducir el contenido de NNK al 3,24%.

Basándose en los resultados anteriormente descritos, se seleccionó la cepa LG5 capaz de degradar específicamente NNK y la cepa LG38 capaz de degradar específicamente la TSNA respectiva.

20 Los resultados anteriormente descritos indican que pueden reducirse significativamente las TSNA en hojas de tabaco tratando las hojas de tabaco con los microorganismos anteriormente mencionados. Los microorganismos anteriormente mencionados se aislaron a partir de hojas de tabaco, y por lo tanto muestran excelente estabilidad cuando se sitúan en hojas de tabaco. Se asume que, debido a su capacidad para fijarse en hojas de tabaco, el microorganismo puede mostrar actividad degradante de TSNA en hojas de tabaco de una manera suficientemente estable.

25

4) Identificación del microorganismo

Las características bacteriológicas de la cepa LG5 y cepa LG38 seleccionadas de este modo se resumen en la Tabla 3 y Tabla 4.

30

Tabla 3

Características bacteriológicas de la cepa LG5	
Artículos ensayados	Características

Características bacteriológicas de la cepa LG5	
Artículos ensayados	Características
Forma	Bastón
Tinción de Gram	-
Espora	-
Motilidad	+
Comportamiento hacia el oxígeno	Aerobio
Oxidasa	+
Catalasa	+
OF	-
Tono de color de la colonia	Amarillento
Reducción de nitrato	-
Producción de indol	-
Fermentación de glucosa	-
Arginina dihidrolasa	-
Ureasa	-
Degradación de esculina	+
Licuabilidad de gelatina	-
β -galactosidasa	-
Utilización	
Glucosa	+
L-arabinosa	+
D-manosa	-
D-manitol	-
N-acetil-D-glucosamina	+
Maltosa	+
Gluconato potásico	+
Ácido n-cáprico	-
Ácido adípico	-
Ácido di-málico	+
Citrato sódico	-
Fenil acetato	-

Tabla 4

Características bacteriológicas de la cepa LG38	
Artículos ensayados	Características
Forma	Bastón
Tinción de Gram	-
Espora	-
Motilidad	+
Comportamiento hacia el oxígeno	Aerobio
Oxidasa	+
Catalasa	+
OF	O

Características bacteriológicas de la cepa LG38	
Artículos ensayados	Características
Tono de color de la colonia	Amarillento
Producción de pigmento fluorescente	-
Reducción de nitrato	+
Producción de indol	-
Fermentación de glucosa	-
Arginina dihidrolasa	-
Ureasa	-
Degradación de esculina	+
Licuabilidad de gelatina	
β -galactosidasa	-
Utilización	
Glucosa	+
L-arabinosa	+
D-manosa	+
D-manitol	+
N-acetil-D-glucosamina	-
Maltosa	-
Gluconato potásico	+
Ácido n-cáprico	+
Ácido adípico	-
Ácido di-málico	+
Citrato sódico	+
Fenil acetato	-

Basándose en los resultados anteriormente descritos, la cepa LG5 se identificó como un microorganismo que pertenece a *Sphingomonas paucimobilis* y LG 38 se identificó como un microorganismo que pertenece a *Pseudomonas fluorescens*. La identificación de las bacterias anteriormente mencionadas se llevó a cabo con la ayuda de Japan Food Research Laboratories.

LG5 se ha depositado en el Depositario de Organismos de Patente Internacional descrito anteriormente el 18 de diciembre de 2001 (número de referencia: FERM BP-7830). De forma similar, LG38 se ha depositado en el Depositario de Organismos de Patente Internacional el 18 de diciembre de 2001 (número de referencia: FERM BP-7831).

Ejemplo 2: Reducción del contenido de TSNA en el proceso de curado por el tratamiento con cepa LG38

Se inoculó cepa LG38 en el caldo TS 1/10 y se cultivó a 30 °C durante 72 horas. Después del cultivo, el medio de cultivo que contenía las células bacterianas se sometió a centrifugación a 5.000 rpm, de modo que las células bacterianas se separaron y se recogieron. Las células bacterianas recogidas de este modo se lavaron con agua destilada esterilizada dos veces y se suspendieron en agua destilada esterilizada. La concentración del microorganismo en la suspensión se ajustó a 10^8 a 10^{10} ufc/ml diluyendo la suspensión con agua destilada esterilizada.

Las hojas de tabaco de la variedad Burley (Kitakami 1) que se habían recogido y llevado al proceso de curado se trataron con la suspensión del microorganismo en la que la concentración del microorganismo se había ajustado por lo tanto a una concentración predeterminada. El tratamiento se llevó a cabo tres veces, es decir, inmediatamente después de la cosecha, 3 días después de la cosecha y 8 días después de la cosecha. En cada tratamiento, la suspensión se pulverizó en las superficies anterior y posterior de las hojas de tabaco por una pulverización de modo que se pulverizaron 10 ml de la misma por cada hoja de tabaco.

Las hojas de tabaco tratadas de este modo se curaron usando una estructura de tubos de acero. Las hojas de

tabaco se recogieron el día 10 y día 21 en el proceso de curado. Las hojas de tabaco recogidas de este modo se cortaron de modo que se separaran en limbos y peciolo. Después los limbos y los peciolo se homogeneizaron usando un mezclador. La parte del limbo se usó para determinar el contenido de TSNA.

- 5 La determinación de los cuatro tipos principales de TSNA (NNN, NNK, NAT y NAB) se llevó a cabo de una manera similar a la descrita en el 2) anteriormente mencionado.

El contenido de TSNA total se expresó como el total de los contenidos respectivos de los cuatro tipos principales de TSNA (NNN, NNK, NAT y NAB). Los resultados se muestran en la Tabla 5.

10

Tabla 5

Contenido de TSNA ($\mu\text{g/g}$)			
Tratamiento	Tiempo (días) después de la cosecha		
	Día 0	Día 10	Día 21
No tratado (Control)	0,53	0,98	3,01
Tratado con agua	0,53	3,48	3,45
Tratado con cepa LG38	0,53	1,09	2,76

El grupo tratado con agua en la Tabla 5 representa un grupo que se trató solamente con agua que no contenía células bacterianas en cada tratamiento.

15

A partir de la Tabla 5, se sabe que el contenido de TSNA aumentó con el paso del tiempo en todos los grupos y que dicho aumento en el contenido de TSNA fue particularmente significativo en el grupo tratado con agua. Cuando el grupo tratado con la cepa de LG38 se compara con el grupo que no recibió tratamiento, el primero mostró menor contenido de TSNA el día 21 que el segundo.

20

Estos resultados indican que la cepa LG38 es capaz de reducir el contenido de TSNA.

Además, también se investigó un efecto del contenido de nitrito (-nitrógeno) en el tratamiento con LG38.

- 25 Se llevó a cabo determinación del contenido de nitrito-nitrógeno de las hojas de tabaco tratadas como se ha descrito anteriormente. El método de determinación se describirá posteriormente en este documento.

En primer lugar, se recogieron 0,5 g de limbo de las hojas de tabaco de cada grupo y se situaron en un tubo de centrífuga de 50 ml. A continuación, se añadieron 25 ml de una solución de extracción descrita posteriormente al mismo. La mezcla se agitó durante 30 minutos y después se extrajo el nitrito. El extracto se filtró usando papel de filtro (ADVANTEC, N° 1). Se recogieron 10 ml del filtrado, se añadieron 0,5 g de carbono activado al mismo y la mezcla se agitó durante 15 minutos. A continuación, el carbono activado se retiró usando un papel de filtro (ADVANTEC, N° 1). El filtrado obtenido de este modo se usó como una muestra para determinar el contenido de nitrito-nitrógeno.

30

Solución de extracción:

KCl	(KCl 1%)
Sulfanilamida	(sulfanilamida 0,5%)
Triton X-100	(Triton X-100 0,1%)

- 40 En la determinación del contenido de nitrito-nitrógeno en el extracto, se usó un autoanalizador (fabricado por BRAN + LUEBBE Co., Ltd., AACSI) y se obtuvo el contenido de nitrito-nitrógeno convirtiendo la transmitancia del filtro a 550 nm al contenido de nitrito-nitrógeno. Para colorear el nitrito-nitrógeno, se usaron sulfanilamida 1% y diclorhidrato de N-naftiletildiamina 0,1%. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Contenido de nitrito-nitrógeno ($\text{NO}_2\text{-N}$) ($\mu\text{g/g}$)		
Tratamiento	Tiempo (días) después de la cosecha	
	Día 0	Día 10
No tratado (Control)	0,71	1,25
Tratado con agua	0,71	3,29
Tratado con cepa LG38	0,71	1,20

45

Como resulta obvio a partir de la Tabla 6, el contenido de nitrito-nitrógeno que es un material en la formación de TSNA aumentó significativamente en el grupo tratado con agua el día 10 en el proceso de curado. Por el contrario, cuando el grupo tratado con cepa LG38 se compara con el grupo que no ha recibido tratamiento, el contenido de nitrito-nitrógeno en el primero fue ligeramente menor que el del segundo el día 10 en el proceso de curado.

5 La cepa LG38 se identificó, basándose en las características bacteriológicas de la misma, como una cepa que es capaz de reducir nitrato. Sin embargo, los resultados anteriormente descritos indican que, en comparación con el grupo que no recibió tratamiento, la cepa LG38 más o menos suprime la reducción de nitrato a nitrito.

10 Ejemplo 3: Efecto del tratamiento con cepa LG5 en el contenido de NNK

El contenido de NNK se determinó de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2, excepto que se reemplazó el microorganismo usado en el método del Ejemplo 2 con LGS.

15 Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Contenido de NNK (µg/g)			
	Tiempo (días) después de la cosecha		
Tratamiento	Día 10	Día 21	Día 32
No tratado (Control)	0,15	0,52	0,29
Tratado con agua	0,71	0,61	0,32
Tratado con cepa LG5	0,59	0,78	0,22

20 Como resulta obvio a partir de la Tabla 7, en el grupo que no recibió tratamiento, el contenido de NNK aumentó hasta el día 21, pero el contenido de NNK el día 32 (cuando se completó el proceso de curado) fue menor que el del día 21. Tanto en el grupo tratado con agua como en el grupo tratado con la cepa LG5, el contenido de NNK fue relativamente alto hasta el día 21, pero el contenido de NNK el día 32 fue menor que el del día 21 como en el caso del grupo que no recibió tratamiento. Cuando el grupo tratado con cepa LG5 se compara con el grupo que no recibió tratamiento, el contenido de NNK el día 32 del primero fue ligeramente menor que el del segundo. Estos resultados
25 indican que la cepa LG5 es capaz de reducir el contenido de NNK.

Debería observarse que los contenidos completos de todos los documentos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva se incorporan en este documento por referencia.

30 Se idearán ventajas y modificaciones adicionales de la presente invención fácilmente por un experto en la materia. La presente invención que puede definirse por dicho alcance mayor no está restringida por los aspectos específicos y representativos de la invención mostrada y descrita anteriormente. Por lo tanto, serán posibles diversas modificaciones de la presente invención sin alejarse del espíritu y el alcance de la idea de la invención completa como se define por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes a las mismas.
35

Ejemplo 4: Efecto del tratamiento con la bacteria degradante de TSNA en el contenido de TSNA en polvo de hoja de tabaco

40 Se inocularon cepa LG5 y cepa LG38 en el caldo TS 1/10, respectivamente, y se cultivaron a 30 °C durante 72 horas. Cada uno de los medios de cultivo que contenía las células bacterianas se sometió a centrifugación a 5.000 rpm, de modo que se recogieron las células bacterianas. Las células bacterianas se lavaron con agua destilada esterilizada dos veces y se suspendieron en agua destilada esterilizada. La concentración de células bacterianas de cada suspensión se ajustó a 10⁸ a 10⁹ ufc/ml, por lo que se obtuvo la suspensión del microorganismo como inóculo.

45 En el experimento de la cepa LG5, se usó polvo liofilizado de los cortes de plantas de tabaco (variedad: Kitakami 1) cultivadas en el Centro de Investigación de Hoja de Tabaco (Oyama-shi, prefectura de Tochigi) de Japan Tobacco Inc. En el experimento de la cepa LG38, se usó polvo liofilizado de la posición del peciolo de la hoja de las mismas plantas de tabaco que se han descrito anteriormente.

50 Cada uno de los tipos respectivos de polvo de tabaco se puso, en una cantidad medida, en un mortero, y se añadió la suspensión del microorganismo al mismo de modo que el contenido de humedad de la mezcla alcanzó un valor predeterminado. La mezcla se mezcló con una mano de mortero de modo que el polvo mostró distribución uniforme del contenido de humedad. El polvo obtenido de este modo se puso, en una cantidad medida, en un matraz de Erlenmeyer y se dejó en reposo a una temperatura predeterminada.
55

Se llevó a cabo el análisis para una muestra tomada del polvo de tabaco antes del tratamiento anteriormente mencionado con el microorganismo y una muestra tomada del polvo de tabaco que se había dejado reposar durante

ES 2 399 630 T3

4 semanas después del tratamiento, respectivamente. Se pusieron 5 g de cada una de las muestras en un matraz de Erlenmeyer de 200 ml, se añadieron al mismo 100 ml de solución acuosa de NaOH 0,01 M (que contenía Thimerosal 100 µg/ml), y se llevó a cabo la extracción durante 2 horas a temperatura ambiente usando un agitador. A continuación, el extracto se filtró con un papel de filtro (ADVANTEC Co., Ltd., N° 5C).

5

A continuación, se analizaron NNN, NNK, NAT y NAB por el método descrito en el Ejemplo 1.

Los contenidos de TSNA antes del tratamiento con el microorganismo y los de cuatro semanas después del tratamiento se muestran en la Tabla 8 y Tabla 9.

Tabla 8 Cambio de los contenidos de TSNA en el polvo de hojas de tabaco provocado por el tratamiento con cepa LG38

Tratamiento	Cepa ensayada	Contenido de humedad (%)	Temperatura de tratamiento (°C)	Antes del tratamiento	
				NNN (µg/g)	NAT (µg/g)
1	LG38	20	20	4,87	2,92
2	LG38	20	30	4,87	2,92
3	LG38	40	20	4,87	2,92
4	LG38	40	30	4,87	2,92

Tratamiento	4 semanas después del tratamiento		Cambio del contenido de NNN (después del tratamiento - antes del tratamiento) (µg/g)	Cambio del contenido de NAT (después del tratamiento - antes del tratamiento) (µg/g)	Cambio del contenido de TSNA (después del tratamiento - antes del tratamiento) (µg/g)
	NNN (µg/g)	TSNA (µg/g)			
1	4,80	7,71	-0,07	-0,01	-0,08
2	4,67	7,22	-0,20	-0,37	-0,57
3	3,93	6,58	-0,94	-0,27	-1,21
4	3,46	6,07	-1,41	-0,31	-1,72

5 * Los valores del contenido NAB y NNN no se muestran debido a que estos valores estuvieron por debajo del límite de detección.

Tabla 9 Cambio del contenido de NNK en polvo de hojas de tabaco provocado por el tratamiento con cepa LG5

Tratamiento	Cepa ensayada	Contenido de humedad (%)	Temperatura de tratamiento (°C)	Antes del tratamiento	4 semanas después del tratamiento	Cambio del contenido de NNK (después del tratamiento - antes del tratamiento) (µg/g)
				NNK (µg/g)	NNK (µg/g)	
1	LG5	20	20	0,90	0,63	-0,27
2	LG5	20	30	0,90	0,33	-0,57
3	LG5	40	20	0,90	0,00	-0,90
4	LG5	40	30	0,90	0,21	-0,69

* el valor del contenido de NAB no se muestra debido a que estaba por debajo del límite de detección

A partir de los experimentos descritos anteriormente, se ha demostrado que la cepa LG5 degrada específicamente NNK, y la cepa LG38 degrada NNN, NAT, NAB y NNK.

5 El contenido de NNK en el polvo de los cortes de plantas de tabaco, se redujo 4 semanas después del tratamiento con cepa LG5, en comparación con el de antes del tratamiento. Cuando los contenidos de NNN y NAT en el polvo de la posición del peciolo de la hoja de plantas de tabaco, cuatro semanas después del tratamiento con cepa LG38 se compararon con los de antes del tratamiento, los contenidos de NNN y NAT se redujeron ambos en todos los grupos tratados. Es decir, en los experimentos en los que se ensayó polvo de tabaco, la cepa LG5 degradó NNK y la
10 cepa LG38 degradó NNN y NAT de una manera similar a la observada en los experimentos anteriormente mencionados.

15 Ejemplo 5: Efecto del tratamiento con la bacteria degradante de TSNA en el contenido de TSNA de hojas de tabaco en almacenamiento

Se inoculó cepa LG38 en caldo TS 1/10 y se cultivó a 30 °C durante 72 horas. Después del cultivo, el medio de cultivo que contenía las células bacterianas se sometió a centrifugación a 5000 rpm, de modo que se recogieron las células bacterianas. Las células bacterianas recogidas de este modo se lavaron con agua destilada esterilizada dos
20 veces y se suspendieron en agua destilada esterilizada. La concentración de las células bacterianas en la suspensión se ajustó a 10⁸ a 10⁹ UFC/ml, por lo que se obtuvo la suspensión del microorganismo como inóculo.

La suspensión del microorganismo preparado de este modo como el inóculo se pulverizó en las superficies anterior y posterior de las hojas de tabaco de tabaco Burley que estaban en el proceso de curado en una estructura de tubos de acero (en el estadio final de secado de peciolo de hojas, día 29, variedad: Kitakami 1) de modo que se
25 pulverizaron 10 ml de la suspensión por cada hoja. Las hojas de tabaco tratadas de este modo se curaron adicionalmente durante 3 días en la estructura de tubos de acero y después se usaron para el ensayo de almacenamiento.

30 Recogida de muestras para analizar: antes de iniciar el almacenamiento de las hojas de tabaco, se recogieron los limbos de media hoja de las hojas de tabaco curadas tomadas de la estructura de tubos de acero como la muestra antes del tratamiento. Se almacenaron el resto de los limbos de media hoja con peciolo. El almacenamiento se llevó a cabo en las condiciones predeterminadas en las que la temperatura y humedad se mantuvieron constantes. Con respecto a las condiciones de almacenamiento, se establecieron tres grupos: temperatura 20 °C y humedad 70%; temperatura 20 °C y humedad 80%; y temperatura 30 °C y humedad 80%, respectivamente. Se llevó a cabo
35 toma de muestras un mes y tres meses después del inicio del almacenamiento. Las hojas de tabaco curadas se almacenaron en las mismas condiciones que se han descrito anteriormente sin tratar las hojas de tabaco con el microorganismo, y las hojas de tabaco obtenidas se usaron como la muestra del grupo de control. Las hojas de tabaco de las que se tomaron muestras de este modo se separaron en limbos y peciolo y después se molieron
40 muestras liofilizadas de los limbos usando un mezclador. Solo la muestra de limbos se usó para determinar el contenido de TSNA.

Se pusieron aproximadamente 5 g de la muestra del limbo de cada uno de los grupos tratados como se ha descrito anteriormente en un matraz de Erlenmeyer de 200 ml, se añadieron al mismo 100 ml de solución acuosa NaOH 0,01 M (que contenía timerosal 100 µg/ml), y se llevó a cabo la extracción durante 2 horas a temperatura ambiente usando un agitador. A continuación, el extracto se filtró con un papel de filtro (ADVANTEC Co., Ltd., N° 5C).
45

NNN, NNK, NAT y NAB se analizaron por el método descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Cambio del contenido de TSNA en hojas de tabaco en el almacenamiento provocado por el tratamiento con el microorganismo

Tratamiento	Temperatura de almacenamiento (°C)	Humedad de almacenamiento (%)	En el momento de inicio de almacenamiento										Un mes después del almacenamiento				
			NNN (µg/g)	NAT (µg/g)	NAB (µg/g)	NKK (µg/g)	TSNA (µg/g)	NNN (µg/g)	NAT (µg/g)	NAB (µg/g)	NKK (µg/g)	TSNA (µg/g)	NNN (µg/g)	NAT (µg/g)	NAB (µg/g)	NKK (µg/g)	TSNA (µg/g)
No tratadas	20	70	0,62	1,63	0,00	0,18	2,43	0,64	1,79	0,00	0,03	2,46					
No tratadas	20	70	1,37	3,32	0,05	0,37	5,11										
No tratadas	30	70	0,86	1,71	0,00	0,13	2,70	0,98	1,92	0,00	0,00	2,90					
No tratadas	30	70	0,51	1,44	0,01	0,21	2,17										
No tratadas	30	80	0,84	1,69	0,00	0,13	2,66	0,92	1,65	0,00	0,00	2,57					
No tratadas	30	80	0,95	2,09	0,00	0,16	3,20										
LG38	20	70	0,51	1,08	0,00	0,09	1,68	0,45	0,94	0,00	0,03	1,42					
LG38	20	70	1,07	2,27	0,00	0,14	3,48										
LG38	30	70	0,62	1,36	0,00	0,11	2,09	0,55	1,20	0,00	0,00	1,75					
LG38	30	70	1,01	1,40	0,00	0,14	2,55										
LG38	30	80	0,54	1,24	0,00	0,14	1,92	0,52	1,18	0,00	0,00	1,70					
LG38	30	80	0,49	1,19	0,00	0,09	1,77										

Tratamiento	Cambio del contenido de almacenamiento (después de almacenamiento - antes de almacenamiento) (µg/g)	Tres meses después de almacenamiento					Cambio del contenido de almacenamiento (después de almacenamiento - antes de almacenamiento) (µg/g)										
		NNN (µg/g)	NAT (µg/g)	NAB (µg/g)	NKK (µg/g)	TSNA (µg/g)	NNN (µg/g)	NAT (µg/g)	NAB (µg/g)	NKK (µg/g)	TSNA (µg/g)						
No tratadas	0,03																
No tratadas		1,52	3,55	0,07	0,00	5,14	0,03										
No tratadas	0,20																
No tratadas		0,98	2,94	0,04	0,00	3,96	1,79										
No tratadas	-0,09																
No tratadas		2,01	2,22	0,02	0,00	4,25	1,05										
LG38	-0,26																
LG38		1,08	2,13	0,00	0,00	3,21	-0,27										
LG38	-0,34																
LG38		1,19	1,42	0,00	0,00	2,61	0,06										
LG38	-0,22																
LG38		0,60	1,06	0,00	0,00	1,66	-0,11										

En los grupos sin tratamiento, un mes después del almacenamiento, el contenido de TSNA aumentó en el “grupo de 20 °C - 70%” y “grupo de 30 °C - 70%”. En los grupos sin tratamiento, tres meses después del almacenamiento, el contenido de TSNA aumentó significativamente en el “grupo de 30 °C - 70%” y “grupo de 30 °C - 80%”, en particular. En los grupos tratados con la cepa LG38, se observó una tendencia a que el contenido de TSNA se redujera tanto después de un mes como después de tres meses. En los grupos tratados con cepa LG38, el contenido de TSNA se redujo significativamente un mes después del almacenamiento, en particular.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir el contenido de TSNA en la hoja de tabaco, **caracterizado por** comprender tratamiento de la hoja de tabaco con un microorganismo que es capaz de reducir TSNA y que se selecciona del grupo que consiste en *Sphingomonas paucimobilis* cepa LG5 y *Pseudomonas fluorescens* cepa LG38.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el tratamiento de la hoja de tabaco con un microorganismo que es capaz de reducir TSNA se lleva a cabo inmediatamente antes de la cosecha de hoja de tabaco y/o en un periodo desde el momento en el que se inicia un proceso de curado al momento en el que se completa un proceso de almacenamiento.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el tratamiento de la hoja de tabaco con un microorganismo que es capaz de reducir TSNA se lleva a cabo pulverizando o aplicando por revestimiento células bacterianas del microorganismo en la hoja de tabaco en un estado de suspensión o en un estado seco.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha TSNA es al menos un tipo de TSNA seleccionada del grupo que consiste en N'-nitrosornicotina, 4-(N-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, N'-nitrosoanatabina y N'-nitrosoanabasina.
- 25 5. El método para reducir el contenido de TSNA en la hoja de tabaco de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la hoja de tabaco se obtiene de una variedad de tabaco seleccionada del grupo que consiste en variedad doméstica japonesa y variedad Burley.
6. Cepa LG5 de *Sphingomonas paucimobilis* (FERM BP-7830) que es capaz de reducir el contenido de TSNA en la hoja de tabaco.
7. Cepa LG38 de *Pseudomonas fluorescens* (FERM BP-7831) que es capaz de reducir el contenido de TSNA en la hoja de tabaco.