

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 211**

51 Int. Cl.:

A24B 13/00 (2006.01)

A24B 3/04 (2006.01)

A24B 3/12 (2006.01)

A24B 15/24 (2006.01)

A24B 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2014 PCT/JP2014/054497**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14156431**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2014 E 14776038 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2957185**

54 Título: **Producto de tabaco oral**

30 Prioridad:

27.03.2013 JP 2013066348

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

10.12.2018

73 Titular/es:

**JAPAN TOBACCO INC. (100.0%)
2-1, Toranomom 2-chome, Minato-ku
Tokyo 105-8422, JP**

72 Inventor/es:

**NAGAI, ATSUSHI;
SATO, SHINSUKE y
YOKOI, MICHINORI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 693 211 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

Producto de tabaco oral

Campo técnico

La presente invención se refiere a un producto de tabaco oral.

5 Antecedentes de la técnica

En productos de tabaco oral, como el snus, la materia prima de tabaco está contenida en un medio de envasado formado por un material tal como tela no tejida. El usuario utiliza el producto colocándolo en la boca.

Debido a que los productos de tabaco orales se usan de esta manera, en la cavidad oral se infiltran a veces ingredientes no deseados contenidos en la materia prima de tabaco. Este problema se aborda, por ejemplo, en los 10 Documentos de Patente 1 a 3, que describen la técnica para reducir la cantidad de nitrosamina contenida en la materia prima de tabaco cuando se fabrican productos de tabaco orales.

El Documento de Patente 1 describe un método que, para reducir la cantidad de nitrosamina presente en la materia prima de tabaco, lleva a cabo un tratamiento que incluye la etapa de irradiar hojas de tabaco con microondas, bloqueando así la posterior formación de nitrosamina en las hojas de tabaco. El Documento de Patente 2 describe el 15 tratamiento para reducir la cantidad de nitrosamina presionando las hojas de tabaco recolectadas y realizando el tratamiento con vapor. El Documento de Patente 3 describe la técnica en la que las hojas de tabaco amarillentas secadas al aire se secan mediante una etapa de secado natural y una etapa de secado controlada, disminuyendo las cantidades de nitrógeno de nitritos y nitrosamina en la materia prima de tabaco.

A diferencia de la técnica anterior, el Documento de Patente 4 describe la técnica relacionada con una composición de cigarrillos sin humo y menciona un agente colorante como se incluye en la composición. 20

Documento de Patente 1: No. de patente 4108754

Documento de Patente 2: No. de patente 3996958

Documento de Patente 3: No. de patente 3922985

Documento de Patente 4: Solicitud de patente abierta a la inspección pública, No. 2009-508523.

25 Naswar – Wikipedia, la enciclopedia libre describe Naswar como un polvo verde que comprende tabaco secado al sol y secado al aire.

Thomas Foley: “Tabaquismo y Salud en las Américas” describe el uso de tabaco verde bruto de los americanos nativos. El documento de patente de EE.UU. 2010/154810 describe el tratamiento térmico de tabaco verde durante un tiempo suficiente para evitar la formación de al menos una nitrosamina.

30 Descripción de la invención

Todos los métodos descritos en los Documentos de Patente 1 a 3, dado que la hoja de tabaco verde no es apta para el consumo humano, realizan un tratamiento de secado (secado por microondas o controlado) después de que la hoja de tabaco recolectada ha perdido su color verde (después de que la mayor parte del tabaco se ha vuelto amarillo). En los métodos descritos en los Documentos de Patente 1 a 3, la elección del momento del tratamiento de 35 la hoja de tabaco recolectada se describe que es al menos después de que el tabaco ya no se encuentre en estado verde.

Sin embargo, el inventor ha descubierto que cuando este tabaco se usa como materia prima para productos de tabaco orales, dependiendo de las condiciones de tratamiento, el tabaco permanece verde incluso después del tratamiento y sus extractos que entran en la cavidad oral son de color claro.

40 En los casos en que, como en el método descrito en, por ejemplo, el Documento de Patente 1, una materia prima de tabaco obtenida realizando un tratamiento de secado en hoja de tabaco que ha cambiado de color a amarillo se usa en un producto de tabaco oral, el color de sus extractos que entra en la cavidad oral se oscurece presuntamente.

Cuando se presenta un extracto que tiene un color tan oscuro, esto puede tener una impresión no deseada en el usuario.

45 Como se ha indicado anteriormente, en el Documento de Patente 4 se menciona un colorante como un material que se incluye en una composición de cigarrillos sin humo. Según dicha técnica, una composición de cigarrillos sin humo se puede distribuir con color, pero la acción de coloración proviene del agente colorante.

En consecuencia, el objetivo de esta invención es proporcionar un producto de tabaco oral en el que el color verde del material de tabaco de partida se mantenga sin usar un agente colorante, y que, cuando la extracción se realiza

usando agua como disolvente, dé un extracto de color claro.

Como resultado de llevar a cabo amplias investigaciones, el inventor ha descubierto que, debido a que un producto de tabaco oral que contiene una materia prima de tabaco obtenida por un procedimiento de tratamiento específico presenta un color verde y un extracto obtenido de la misma usando agua como disolvente extractor es de color claro, los problemas anteriores se pueden resolver.

La invención se enumera a continuación.

[1] Un producto de tabaco oral que incluye una materia prima de tabaco que tiene un valor de a^* , expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de la misma obtenido usando agua como un disolvente de extracción, tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz de 1,0 o menos.

[2] El producto de tabaco oral según [1], en donde la materia prima de tabaco se obtiene mediante un método de tratamiento que incluye: una etapa de calentamiento de la materia prima de tabaco a condición de que se desactive una enzima contenida en ella que provoca el color marrón enzimático; y una etapa de reducción del contenido de humedad de la materia prima de tabaco, en donde el tratamiento de la materia prima de tabaco se realiza después de recolectar las hojas de tabaco que sirven como material de partida para la materia prima de tabaco y antes de que el valor de a^* expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$ sea mayor que 1,0 para el 60% o más de las áreas superficiales de las hojas de tabaco recolectadas.

[3] El producto de tabaco oral según [2], en donde el calentamiento en el método de tratamiento se realiza en condiciones de 80 a 100°C.

[4] El producto de tabaco oral según [2] ó [3], en donde la etapa de reducir el contenido de humedad de las hojas de tabaco en el método de tratamiento se realiza antes de la etapa de realización del calentamiento, a una presión reducida inferior a 0,1 MPa y una temperatura de 37°C o menos.

[5] El producto de tabaco oral según [2] ó [3], en donde la etapa de reducir el contenido de humedad de las hojas de tabaco en el método de tratamiento se realiza al mismo tiempo o después de la etapa de realización del calentamiento.

[6] El producto de tabaco oral según cualquiera de [2] a [5], en donde la etapa de realización del calentamiento se realiza mediante calentamiento por vapor, calentamiento por microondas o calentamiento por flujo de gas.

[7] El producto de tabaco oral según cualquiera de [1] a [6], en donde la proporción en peso de la materia prima de tabaco que tiene un valor de a^* , expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de la misma obtenido usando agua como disolvente de extracción tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz de 1,0 o menos, representa el 40% en peso o más de la materia prima total de tabaco.

La invención proporciona un producto de tabaco oral para el cual el extracto que entra en la cavidad oral del usuario en el momento de su uso no es de color oscuro. En el producto de tabaco oral de la invención, la materia prima de tabaco que compone el producto de tabaco oral conserva un color verde.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1A es un gráfico que muestra el grado de verdor cuando se realizó el secado convencional y cuando se realizó el secado por microondas, usando tres tipos de hoja de tabaco. La Fig. 1B es un gráfico que muestra valores colorimétricos (ABS a 420 nm) para extractos de materias primas de tabaco obtenidas usando los mismos materiales de partida y procedimiento que en la Fig. 1A.

La Fig. 2A es un gráfico que muestra valores colorimétricos (valores de a^*) cuando la hoja de tabaco se calentó a las diversas temperaturas mostradas en el gráfico. La Fig. 2B es un gráfico que muestra valores colorimétricos (ABS a 420 nm) para extractos de materias primas de tabaco obtenidas usando los mismos materiales de partida y procedimiento que en la Fig. 2A.

La Fig. 3A es un gráfico que muestra valores colorimétricos (valores de a^*) de diversas materias primas de tabaco cuando la hoja de tabaco se calentó en tres condiciones de temperatura y se varió el tiempo de calentamiento. La Fig. 3B es una gráfica que muestra valores colorimétricos (ABS a 420 nm) para extractos de las diversas materias primas de tabaco obtenidas mediante calentamiento de los mismos materiales de partida en las mismas condiciones de calentamiento que en la Fig. 3A.

La Fig. 4A es un gráfico que muestra los valores colorimétricos (valores de a^*) obtenidos después del tratamiento térmico de la hoja de tabaco recolectada en tres condiciones diferentes. La Fig. 4B es un gráfico que muestra valores colorimétricos (ABS 420 nm) para extractos de las diversas materias primas de tabaco obtenidas mediante calentamiento de los mismos materiales de partida en las mismas condiciones de calentamiento que en la Fig. 4A.

La Fig. 5 presenta gráficos que muestran la relación de la proporción de mezcla entre la materia prima de tabaco de la invención y otra materia prima de tabaco, cuando éstas se mezclan entre sí, frente al valor de a^* (Fig. 5A) y frente

a la absorbancia (ABS a 420 nm) (Fig. 5B).

La Fig. 6 muestra un ejemplo de los puntos (mostrados como estrellas en el diagrama) seleccionados para la colorimetría de la hoja de tabaco (valores de a^*) antes del tratamiento.

Modo para realizar la invención

- 5 La invención se describe con detalle a continuación por medio de realizaciones, ejemplos y similares. Sin embargo, la invención no se limita a las siguientes realizaciones y ejemplos, y puede ponerse en práctica usando modificaciones cualesquiera de los mismos con tal de que no se aparten del espíritu y alcance de la invención.

Materia prima de tabaco

- 10 El tipo de tabaco que sirve como materia prima de tabaco utilizada en el producto de tabaco oral de la invención, aunque no está particularmente limitado, se ejemplifica mediante las siguientes variedades del género *Nicotiana*: las variedades curado al aire caliente y burley de *N. tabacum*, y la variedad Brasilia de *N. rustica*.

Las hojas de tabaco usadas como materia prima de tabaco, a diferencia de las invenciones citadas en la bibliografía de la técnica anterior, se suministran para las etapas de tratamiento mostradas más adelante antes de que su color se vuelva amarillo; es decir, cuando las hojas son en su mayor parte verdes.

- 15 En esta memoria, la frase “volverse amarillo” significa que una gran mayoría (por ejemplo, 60% o más, o incluso 90% o más) del área superficial de la hoja recolectada ha cambiado de color en la medida en que el valor de a^* expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$ se convierte en un valor mayor que 1,0. El pigmento (verde) presente en la hoja de tabaco disminuye después de que se ha recolectado la hoja, provocando que la hoja de tabaco se vuelva amarilla. El valor de a^* después de la recolección de la hoja de tabaco es generalmente de aproximadamente -9 a aproximadamente -1,5.

La materia prima de tabaco usada en el producto de tabaco oral de la invención tiene un valor de a^* (o verdor), expresado mediante el método $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de esta materia prima de tabaco, obtenido usando agua como disolvente de extracción, tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz de 1,0 o menos.

- 25 La materia prima de tabaco usada en el producto de tabaco oral de la invención no está particularmente limitada siempre que satisfaga las condiciones anteriores. Después de la recolección, la porción de la hoja de tabaco de la que se ha separado la nervadura central puede suministrarse a las operaciones de tratamiento. Alternativamente, después de la recolección, a la hoja de tabaco se le puede eliminar la humedad mediante presión o similar, y después suministrarse a las operaciones de tratamiento. O, después de la recolección, la hoja de tabaco puede ser refrigerada o congelada y almacenada, y posteriormente suministrada a las operaciones de tratamiento.

- 30 Cuando menor sea el valor de a^* en el método de $L^*a^*b^*$, más intenso será el color verde. El color verde puede fortalecerse recolectando la hoja de tabaco en una etapa más temprana que cuando la hoja de tabaco se usa en cigarrillos comunes. Tener el límite inferior del intervalo en el valor de a^* de -20 o superior es adecuado desde el punto de vista de garantizar el color verde de la materia prima de tabaco. En los casos en que se desea hacer más fuerte el color verde de la materia prima de tabaco, es conveniente que el verdor (valor de a^*) sea -2 o inferior.

- 35 La medida del valor de a^* de la materia prima de tabaco se puede realizar usando un molino triturador para moler hasta obtener una materia prima de tabaco de tamaño de 1 a 2 mm (malla) que se ha secado hasta un contenido de humedad de 3 a 5% en peso, y el color de la muestra molida se puede medir usando un espectrofotómetro. Las definiciones de color son las expresadas en el espacio de color $L^*a^*b^*$ utilizado por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) y JIS.

En la operación de medida del color, se puede obtener un resultado numérico vertiendo el polvo de la muestra en un recipiente de vidrio hasta un espesor de capa de 1 cm, dirigiendo una luz estándar (Iluminante Estándar D65 para colorimetría, un iluminante estándar definido por la CIE y la ISO) a la muestra desde el fondo del recipiente, y midiendo la luz reflejada (método de medida del color reflejado / componente especular excluido (SCE)).

- 45 El valor de a^* se puede ajustar variando la temperatura y tiempo del tratamiento térmico en las operaciones de tratamiento de materia prima de tabaco descritas posteriormente.

Específicamente, se puede suprimir un aumento en el valor de a^* bajando la temperatura o acortando el tiempo de tratamiento térmico.

La medida del valor de a^* de la hoja de tabaco antes del tratamiento se realiza como sigue.

- 50 Se mide el color en 20 lugares de la superficie de una hoja de tabaco usando un espectrofotómetro (KONICA MINOLTA/CM3500d, de Konica Minolta Holdings, Inc.). Las definiciones de color, como con la medida de color descrita anteriormente de la materia prima de tabaco, se expresan en el sistema de color $L^*a^*b^*$. Los 20 lugares en la superficie de la hoja de tabaco se seleccionan de manera uniforme en, por ejemplo, las partes central y periférica

de la hoja de tabaco, como lo indican las estrellas (★) en la Fig. 6.

5 La operación de medida del color se realiza dirigiendo una luz estándar (iluminante estándar D65 para colorimetría, un iluminante estándar definido por la CIE y la ISO) a la muestra y midiendo la luz reflejada (método de medida del color reflejado / componente especular excluido (SCE)), y los resultados se representan en valores numéricos. Se puede considerar que un valor de a^* menor obtenido al medir la hoja de tabaco en estas condiciones es indicativo de un color más verde.

Además, un extracto de la materia prima de tabaco de la invención, que se obtiene usando agua como disolvente de extracción, tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz (también indicada en esta memoria como “ABS a 420 nm”) de 1,0 o menos.

10 En los casos en que el tratamiento anterior se haya realizado en la materia prima de tabaco, esta absorbancia es generalmente 0,2 o más.

El extracto se obtiene realizando un procedimiento como el siguiente.

15 Una parte en peso de materia prima de tabaco obtenida reduciendo el contenido de humedad al 5% en peso o menos y moliendo, se pesa y se añade a 25 partes en peso de agua a 22°C, y la extracción con agitación se realiza durante aproximadamente 10 minutos. El extracto se deja entonces reposar a la misma temperatura durante aproximadamente 20 minutos, tras lo cual se filtra con un filtro de membrana de 0,20 μm . El extracto filtrado se diluye dos veces con agua y se mide la absorbancia de luz a 420 nm de longitud de onda usando un espectrofotómetro de absorción.

20 En esta invención, el valor numérico de la absorbancia medida en estas condiciones se denomina también “grado de color marrón”; un valor numérico más grande indica un mayor grado de color marrón. Para los fines de esta invención, “marrón” y “de color marrón” son sinónimos.

Este grado de color marrón se puede ajustar variando la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico en la operación de tratamiento de materia prima de tabaco descrita posteriormente.

25 Específicamente, es posible eliminar un aumento del grado de color marrón elevando la temperatura del tratamiento térmico o prolongando el tiempo del tratamiento térmico.

Producto de tabaco oral

El producto de tabaco oral de la invención se ejemplifica por el snus, goma, tabaco masticable, rapé, tabaco comprimido (comprimidos, barras, etc.), y películas comestibles.

30 El producto de tabaco oral de la invención se puede obtener mediante, por ejemplo, el siguiente método de tratamiento.

La materia prima de tabaco usada en el producto de tabaco oral de la invención se obtiene mediante un método de tratamiento, que incluye la etapa de calentar la materia prima de tabaco en condiciones que desactivan una enzima contenida en ella que provoca color marrón enzimático y la etapa de reducir el contenido de humedad de la materia prima de tabaco.

35 Como se ha mencionado anteriormente, al pasar por un método de tratamiento que incluye las etapas de calentar en condiciones específicas y reducir el contenido de humedad de la materia prima de tabaco, es posible no solo mantener bajo el valor de a^* de la materia prima de tabaco resultante (es decir, mantener el color verde), sino también reducir el color marrón del extracto.

40 La técnica anterior descrita anteriormente incluye la etapa de, después de que la hoja de tabaco recolectada se ha vuelto amarilla, secar la hoja amarillenta. En tal caso, el color de un extracto de la materia prima de tabaco se vuelve más oscuro. Concretamente, en el caso de la materia prima de tabaco obtenida a través de la etapa de secar (tal como por irradiación con microondas) la hoja de tabaco después de que se ha recolectado y se ha vuelto amarilla, el extracto tiene normalmente un valor colorimétrico (ABS a 420 nm) de aproximadamente 1,4 o superior.

45 En cambio, en esta invención, como se ha indicado anteriormente, la etapa de tratamiento se realiza antes de que el color de la hoja de tabaco se vuelva amarillo.

En esta invención, las “condiciones que desactivan una enzima que provoca un color marrón enzimático” se refieren a condiciones tales que el valor de la actividad enzimática (actividad de polifeniloxidasa (PPO)), medido utilizando el procedimiento descrito más adelante, llega a ser 0,02 U o menos.

50 El valor de la actividad enzimática se puede obtener añadiendo a una célula de espectrofotómetro de absorción y mezclando conjuntamente una disolución de proteína enzimática extraída de la muestra y una disolución tampón de fosfato potásico (pH 6,0), luego añadiendo a la mezcla una disolución de pirocatecol 10 mM como sustrato, y midiendo a 40°C el aumento de absorbancia de luz a 420 nm de longitud de onda con respecto a una referencia.

Como referencia se puede usar una disolución obtenida mezclando en agua desionizada en lugar de la disolución de proteína enzimática.

Después de restar el aumento de absorbancia con respecto a la referencia, la cantidad de enzima que aumenta la absorbancia de la muestra (Δ ABS) en 0,01 durante un periodo de un minuto se define como 1 U.

- 5 En la mencionada etapa de tratamiento de materia prima de tabaco, las “condiciones que desactivan una enzima que provoca color marrón enzimático” se refieren a las condiciones en las que la actividad de la enzima (actividad PPO) en la hoja de tabaco llega a ser 0,02 U o menos. Un ejemplo de tales condiciones es el calentamiento a 80 a 100°C. El tiempo de calentamiento en este caso es normalmente 40 minutos o menos, y se puede ajustar de acuerdo con la temperatura de calentamiento dentro de un intervalo en el que el valor de a^* no experimente un gran aumento.

Al pasar a través de dicho calentamiento, se desactiva la enzima que provoca el color marrón enzimático en la hoja de tabaco, como resultado de lo cual la materia prima de tabaco no cambia de color y permanece verde. Además, se puede preparar un extracto de la materia prima de tabaco de color claro (que tiene una pequeña ABS a 420 nm).

- 15 Una realización en la que dicho calentamiento se realiza a 85°C o más durante 10 minutos o menos, y especialmente a 90°C o más durante 5 minutos o menos, es más preferida, tanto desde el punto de vista de la materia prima de tabaco que no cambia de color y que permanece verde, como también desde el punto de vista del color del extracto que permanece de color claro.

Las temperaturas mencionadas anteriormente no se refieren al ajuste de temperatura del aparato de calentamiento, sino a la temperatura de la propia hoja de tabaco calentada.

- 20 La mencionada etapa de calentamiento se ejemplifica mediante métodos realizados por irradiación con microondas o luz infrarroja, métodos realizados mediante aplicación de vapor, métodos realizados por inmersión en agua caliente, métodos realizados mediante aplicación de aire caliente (calentamiento por flujo de gas), y métodos que implican contacto directo con un medio tal como metal calentado. De éstos, se prefiere el calentamiento por flujo de gas desde el punto de vista de conveniencia en la producción.

- 25 Con respecto a la mencionada etapa de calentamiento, al llevar la hoja de tabaco a la temperatura deseada, es preferible que la temperatura se eleve lo más rápido posible y para que sea lo más corto posible el tiempo en que la temperatura permanece en los niveles de temperatura (de 30°C a 85°C) durante el aumento de temperatura. Esto es para evitar que la enzima que provoca el color marrón enzimático dentro de la hoja de tabaco funcione durante el aumento de temperatura.

- 30 Cuando el calentamiento mencionado se realiza por irradiación con microondas, en una realización, la irradiación con microondas se realiza normalmente a una frecuencia de aproximadamente 900 a aproximadamente 2.500 MHz.

- 35 Los métodos de calentamiento aplicando vapor a la hoja de tabaco se ejemplifican mediante métodos en los que el vapor sobrecalentado, que es vapor obtenido calentando adicionalmente vapor saturado a la misma presión para darle una temperatura más alta que la temperatura de saturación, se aplica a la hoja de tabaco o la hoja de tabaco se trata con vapor a la presión de vapor saturado, que es una presión (presión manométrica) de 0,1 MPa o más.

Los métodos para realizar el calentamiento dirigiendo aire caliente a la hoja de tabaco se ejemplifican mediante el método de, por ejemplo, pasar una corriente de aire que tiene una temperatura de 90°C o superior y una humedad relativa de 90% a través de la hoja de tabaco durante 10 minutos o menos.

- 40 Los métodos para realizar el tratamiento térmico por inmersión en agua caliente se ejemplifican mediante la ebullición, en los que la hoja de tabaco se sumerge en agua hirviendo.

Además de la mencionada etapa de calentamiento, las operaciones realizadas cuando se produce materia prima de tabaco a usar en el producto de tabaco oral incluyen, por ejemplo, la etapa de reducir el contenido de humedad de la hoja de tabaco.

- 45 Incluir no solamente la mencionada etapa de calentamiento, sino también la etapa de reducir el contenido de humedad ayuda tanto a mantener el verdor de la materia prima de tabaco como a mantener también el color claro del extracto de la materia prima de tabaco.

- 50 Los métodos para reducir el contenido de humedad de la hoja de tabaco incluyen el secado neumático y liofilización en donde se aplica una corriente de aire a baja temperatura, temperatura normal o alta temperatura a la hoja de tabaco que está en reposo o fluidizada, secado por irradiación con microondas o luz infrarroja, y secado por contacto directo con un medio tal como metal calentado.

Las mismas condiciones y aparatos que cuando se realiza el calentamiento anteriormente descrito se pueden usar para el secado mediante la aplicación de una corriente de aire a alta temperatura (aire caliente), el secado por microondas o luz infrarroja, y el secado por contacto directo con un medio tal como metal calentado.

La mencionada etapa en que se realiza el calentamiento y la mencionada etapa en que se reduce el contenido de humedad de la hoja de tabaco son ambas esenciales para preparar la materia prima de tabaco de la invención.

Combinaciones ejemplares en las que se pueden realizar estas etapas se muestran a continuación.

5 1. Calentamiento antes del secado: por ejemplo, se realiza calentamiento por flujo de gas como etapa de calentamiento, después de lo cual se realiza liofilización.

2. Calentamiento durante el secado: en esta realización, el calentamiento de la materia prima de tabaco y la reducción del contenido de humedad se realizan al mismo tiempo mediante, por ejemplo, irradiación con microondas.

10 3. Calentamiento después del secado: en esta realización, el contenido de humedad de la hoja de tabaco se reduce, tras lo cual se realiza el calentamiento (por ejemplo, calentamiento mediante un método que mantiene la temperatura real del tabaco a 80°C o más durante 10 minutos o menos, tal como la transferencia de calor por condensación mediante vapor calentado, transferencia de calor por convección mediante una corriente de aire, o transferencia de calor por conducción mediante contacto con un objeto a alta temperatura tal como metal o plástico).

15 Independientemente de cuál de los métodos anteriores 1 a 3 se realice, el verdor de la materia prima de tabaco resultante se mantiene y el grado de color marrón del extracto disminuye.

Además, independientemente de cuál de los métodos anteriores 1 a 3 se use, el contenido de humedad de la materia prima de tabaco llega a ser 20% en peso o menos, preferiblemente 10% en peso o menos, y más preferiblemente 5% en peso o menos.

20 Cuando en una realización preferida se lleva a cabo el método 1 anterior, la hoja de tabaco recolectada se somete a calentamiento a 85°C o más durante 10 minutos o menos, tras lo cual el contenido de humedad de la materia prima de tabaco se reduce usando un método de liofilización conocido.

Cuando en una realización preferida se lleva a cabo el método 2 anterior, la hoja de tabaco recolectada se irradia con microondas para llevar la hoja de tabaco hasta 85°C o más, calentando y reduciendo de este modo el contenido de humedad durante 10 minutos o menos.

25 Cuando en una realización preferida se lleva a cabo el método 3 anterior, la operación de reducir el contenido de humedad de la hoja de tabaco recolectada conlleva, por ejemplo, realizar una liofilización para reducir el contenido de humedad de la materia prima de tabaco a 20% en peso o menos, preferiblemente 10% en peso o menos, e incluso más preferiblemente 5% en peso o menos; después realizar un calentamiento durante 10 minutos o menos a una temperatura real de la hoja de tabaco de 85°C o más a través de, por ejemplo, transferencia de calor por condensación mediante vapor calentado, transferencia de calor por convección mediante una corriente de aire, o transferencia de calor por conducción mediante contacto con un objeto a alta temperatura tal como metal o plástico.

30 Cuando se realiza el método 3 anterior, para suprimir una disminución del pigmento verde contenido en la hoja de tabaco, es preferible realizar la etapa de reducir el contenido de humedad a una presión inferior a 0,1 MPa y a 37°C o menos. En la etapa de reducción del contenido de humedad, la presión es más preferiblemente 0,05 MPa o menos, e incluso más preferiblemente 0,01 MPa o menos. Esta etapa se realiza más preferiblemente a una temperatura de 0°C o menos.

En cada una de las realizaciones anteriores, la hoja de tabaco usada en el tratamiento se usa después de ser recolectada y antes de que el valor de a^* (verdor) sea mayor que 1,0.

40 La materia prima de tabaco usada en el producto de tabaco oral de la invención se obtiene mediante un tratamiento que incluye, como se ha descrito anteriormente, la etapa de calentamiento y la etapa de reducir el contenido de humedad. Si se tratara simplemente de aumentar el verdor (valor de a^*) de la materia prima de tabaco después del secado, bastaría con la liofilización sola. Sin embargo, la materia prima de tabaco obtenida realizando liofilización sola incurre en una disminución pronunciada de la calidad después del secado y, junto con la absorción de humedad después del secado, experimenta un color marrón.

45 Además, los extractos de las materias primas de tabaco que solo se han liofilizado sufren un pronunciado color marrón. En este caso, no se satisfacen las características esenciales de la invención, a saber, que la materia prima de tabaco es de color verde y que un extracto de la misma tiene un bajo grado de color marrón.

La desactivación de una enzima que provoca color marrón enzimático al pasar por la etapa de realizar el calentamiento descrito anteriormente es eficaz como condición para evitar que el extracto se vuelva marrón.

50 Producto de tabaco oral

En los casos en los que el producto de tabaco oral de la invención se fabrica en, por ejemplo, snus, este producto se obtiene usando un conocido método para introducir la materia prima de tabaco descrita anteriormente en un medio

de envasado formado por un material tal como tela no tejida. Por ejemplo, el snus se obtiene realizando el llenado mientras se ajusta la cantidad de materia prima de tabaco, y realizando el sellado usando un medio tal como el sellado térmico.

5 El medio de envasado puede usarse sin ninguna limitación particular, aunque se puede hacer uso preferido de tela no tejida basada en celulosa.

10 En los casos en que el producto de tabaco oral de la invención es una goma, por ejemplo, esta goma puede obtenerse utilizando un método conocido para mezclar la materia prima de tabaco descrita anteriormente usada en esta invención junto con una base de goma conocida. En el caso de tabaco masticable, rapé y también tabaco comprimido, aparte de usar la materia prima de tabaco descrita en esta invención, éstos pueden obtenerse mediante métodos conocidos.

15 En el producto de tabaco oral de la invención, la proporción en peso de la cantidad total de materia prima de tabaco representada por la materia prima de tabaco que tiene un valor de a^* , expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de ella, obtenido usando agua como disolvente de extracción, tiene una absorbancia de luz de 1,0 o menos a 420 nm de longitud de onda, puede ajustarse adecuadamente, pero es preferiblemente lo más grande posible, siendo preferida una proporción de 40% en peso o más, siendo más preferida una proporción de 60% en peso o más, siendo incluso más preferida una proporción de 80% en peso o más, siendo aún más preferida una proporción de 98% en peso o más, y siendo la más preferida una proporción de 100% en peso.

20 En los casos en que se incluyen materias primas de tabaco distintas de la materia prima de tabaco específica descrita anteriormente en el producto de tabaco oral de la invención, se hace uso de materias primas de tabaco que no restan valor a los efectos convenientes de la invención.

En el producto de tabaco oral de la invención, como se ha explicado anteriormente, debido a que es pequeño el grado en que el extracto de la materia prima de tabaco se vuelve marrón, es probable que se elimine la filtración del color marrón al medio de envasado. Además, el color de la materia prima de tabaco se mantiene verde.

Ejemplos

25 La invención se describe más detalladamente a continuación a modo de ejemplos. Sin embargo, la invención, en la medida en que no se aleje de su espíritu y alcance, no se limita a los siguientes ejemplos.

De aquí en adelante, la invención se describe más detalladamente a continuación a modo de ejemplos. Sin embargo, la invención no se limita a los siguientes ejemplos, en la medida en que no se aleje de su espíritu y alcance.

30 Ejemplo experimental 1-1

Influencia de las diferencias en el método de secado de las hojas de tabaco (secado convencional y secado por microondas)

35 Se realizó un experimento en el que tres variedades de hoja de tabaco se sometieron a secado convencional o secado por microondas, y se midió la apariencia (color percibido) de las hojas secas. Las variedades de materia prima fueron respectivamente Burley (BLY), tabaco curado al aire caliente (FCV), y *A. rustica* (Rustica).

El color percibido de la apariencia se midió mediante el siguiente procedimiento.

40 Una materia prima de tabaco que se secó hasta un contenido de humedad de 3 a 5% se trituró a un tamaño de malla de 1 a 2 mm usando un molino triturador (MiniBlender, de Melitta Japan, Ltd. (Tokyo, Japan)), y el color de la muestra molida se midió usando un espectrofotómetro (KONICA MINOLTA/CM3500d, de Konika Minolta Holdings, Inc.). Las definiciones de color se expresaron en el sistema de color $L^*a^*b^*$ usado por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) y JIS.

45 En la operación de medida del color, se obtuvieron resultados numéricos vertiendo el polvo de la muestra en un recipiente de vidrio hasta un espesor de capa de 1 cm, dirigiendo una luz estándar (Iluminante Estándar D65 para colorimetría, un iluminante estándar definido por la CIE y la ISO) a la muestra desde el fondo del recipiente, y midiendo la luz reflejada (método de medida del color reflejado / componente especular excluido (SCE)).

Los resultados se muestran en la Fig. 1A.

50 El eje vertical (a^*) en la Fig. 1A muestra los datos del espectrofotómetro expresados por el método de $L^*a^*b^*$; un valor de a^* más pequeño indica un color más verde. Al comparar los valores de medida del color, para los tres tipos de materias primas, la hoja secada por microondas tenía un mayor grado de verdor que la hoja de tabaco secada convencionalmente.

Además, en esta invención se usaron los siguientes métodos de secado como secado convencional, dependiendo de la variedad de la hoja de tabaco. Los siguientes métodos de secado convencional se realizaron todos bajo

presión normal.

5 En el caso de tabaco curado al aire caliente, la hoja de tabaco recolectada se seca en una etapa llamada "curado al aire caliente". Generalmente, después de ser recolectada, la hoja se cura durante 3 días en una sala de secado con control de humedad a 30 a 50°C, tras lo cual se seca durante 2 días a aproximadamente 70°C, reduciéndose de este modo la humedad en la materia prima de tabaco a 5% en peso o menos.

En el caso del tabaco Burley, la hoja de tabaco recolectada se seca mediante una etapa llamada "curado al aire". Generalmente, después de ser recolectada, la hoja se seca hasta un contenido de humedad de 15% en peso o menos durante un período de 30 a 35 días en un ambiente de humedad controlada desde la temperatura exterior a 35°C.

10 En el caso de *N. rustica*, la hoja de tabaco recolectada se seca en una etapa llamada "curado al aire y sol". Generalmente, después de ser recolectada, la hoja se seca al sol a la temperatura exterior durante un periodo de aproximadamente varios días a una semana.

Ejemplo experimental 1-2

15 Se midieron los colores de los extractos obtenidos de los tres mismos tipos de materias primas que en el ejemplo experimental 1-1. Los resultados se muestran en la Fig. 1. Los colores de los extractos, como se ha explicado anteriormente, se expresan mediante la absorbancia de luz a 420 nm de longitud de onda. Una mayor absorbancia (mayor valor del eje Y) indica un color más marrón.

20 El grado de color marrón de los extractos de materia prima de tabaco se midió mediante el método siguiente. Se pesó materia prima (hoja de tabaco), secada hasta un contenido de humedad de 5% o menos, en una cantidad de 0,4 g, después se añadieron 10 mL de agua y se realizó extracción con agitación durante 10 minutos a 22°C. Después de agitar, el extracto se dejó reposar a 22°C durante 20 minutos, después se filtró con un filtro de membrana de diámetro de poro de 0,20 µm (membrana de PVDF Whatman, de GE Healthcare UK, Ltd. (Buckinghamshire, UK)). La disolución resultante se diluyó dos veces con agua, y se midió la absorbancia de luz a 420 nm de longitud de onda usando un espectrofotómetro.

25 Como se muestra en la Fig. 1B, para cada uno de los tres tipos de materia prima, los extractos de materias primas de tabaco obtenidos mediante secado por microondas tenían un grado menor de color marrón que los extractos de materia prima de tabaco obtenidos por secado convencional.

30 Es decir, en comparación con los casos en que una materia prima de tabaco secada convencionalmente se usa como material de partida en un producto de tabaco oral, cuando se usa una materia prima de tabaco secada por microondas como material de partida en un producto de tabaco oral, se puede esperar que el color de la saliva en la boca sea más claro y que la tela no tejida que forma el medio de envasado en el producto de tabaco oral no se vuelva de color marrón después del uso.

Ejemplo experimental 2

Diversos efectos a la temperatura de calentamiento respectiva

35 El tratamiento térmico se realizó en la hoja de tabaco, y se midió la apariencia (color percibido) de la hoja de tabaco en ese momento, así como la apariencia del extracto (color percibido).

La hoja de tabaco usada aquí fue una Burley liofilizada.

40 Tratamiento térmico: El calentamiento se realizó a 40 a 100°C durante 10 minutos. La hoja de tabaco usada como material de partida se envasó al vacío, después se trató térmicamente en un baño de agua caliente. Los resultados se muestran en las Figs. 2A y 2B. Es evidente a partir de estos resultados (los valores colorimétricos cuando la hoja de tabaco (la hoja obtenida liofilizando tabaco Burley) se calentó a las temperaturas respectivas durante 10 minutos) que el verdor disminuye con el calentamiento a 80°C o más (Fig. 2A). Por otra parte, con un calentamiento a 85°C o más, el color de un extracto de la materia prima de tabaco tratada térmicamente se vuelve más claro (el grado de color marrón disminuye) (Fig. 2B).

45 Ejemplo experimental 3

Diversos efectos en los respectivos tiempos de calentamiento

El tratamiento térmico se realizó en la hoja de tabaco, y la apariencia (color percibido) en ese tiempo así como la apariencia (color percibido) de sus extractos se midieron mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo experimental 1.

50 Los tipos de hoja de tabaco usados fueron Burley y tabaco liofilizado.

Condiciones de tratamiento térmico: tres niveles de 80, 90 y 100°C, un tiempo de calentamiento de 1 a 40 minutos, y

el mismo método de calentamiento que en el ejemplo experimental 2.

5 La Fig. 3A muestra los valores de medida de color para la materia prima tratada cuando la hoja de tabaco (hoja de Burley liofilizada) se trató térmicamente en tres condiciones - 80°C, 90°C y 100°C - para tiempos de tratamiento térmico variables. A cada una de estas temperaturas, el grado de verdor disminuyó con el paso del tiempo de calentamiento. A una temperatura de calentamiento más alta, el color se desvaneció en un tiempo más corto.

La Fig. 3B muestra el grado de color marrón de extractos de la materia prima tratada cuando la hoja de tabaco (hoja de Burley liofilizada) se trató térmicamente en tres condiciones - 80°C, 90°C y 100°C - para tiempos de tratamiento térmico variables. Con el paso del tiempo de calentamiento, se descubrió que el grado de color marrón de la materia prima tratada se suprimía cada vez más.

10 A partir de estos resultados, aunque el grado de color marrón del extracto fue sustancialmente el mismo (Fig. 3B) con 30 minutos de calentamiento a 80°C (A), 5 minutos a 90°C (B), y 2 minutos de calentamiento a 100°C (C), el grado de verdor en estos casos difirió completamente (Fig. 3A).

Ejemplo experimental 4

Selección del tiempo de la etapa de calentamiento

15 La apariencia de la materia prima de tabaco (Fig. 4A) y la apariencia del extracto de la materia prima de tabaco (Fig. 4B) se examinaron cuando el tratamiento térmico se realizó en diversos momentos, a saber, antes, durante o después del secado de la hoja de tabaco.

La hoja de tabaco usado fue de tabaco Burley, y el método de tratamiento usado en los ejemplos se realizó como sigue.

20 • Calentamiento antes del secado: las hojas recolectadas se calentaron por flujo de gas (85°C, 10 minutos), y después se liofilizaron.

• Calentamiento durante el secado: las hojas recolectadas se calentaron y se secaron mediante calentamiento por microondas.

25 • Calentamiento después del secado: las hojas recolectadas se liofilizaron, después se calentaron a 100°C durante 3 minutos.

• Control: materia prima obtenida mediante calentamiento convencional de Burley (hoja curada al aire).

30 De los resultados mostrados en las Figs. 4A y 4B se descubrió que, independientemente de si el tratamiento térmico se realiza antes, durante o después del secado, siempre que se cumplan ciertas condiciones fijas, se puede garantizar el verdor de la materia prima de tabaco y la decoloración (oscurecimiento del color) se puede evitar. Las condiciones fijas son que el tratamiento térmico y el secado se completen antes de que las hojas cambien de color y, como en el ejemplo experimental 3, que el tratamiento térmico se realice a alta temperatura y durante un corto periodo de tiempo.

Ejemplo experimental 5

35 Se midió la relación entre el valor de a^* y la absorbancia (420 nm) obtenidos cuando se mezclan conjuntamente la materia prima de tabaco de la invención (valor de a^* , -11,0; absorbancia de luz en el extracto a 420 nm de longitud de onda, 0,3) y otra materia prima de tabaco (una materia prima de tabaco normalmente usada en productos de tabaco orales; valor de a^* , 8,31; absorbancia de luz en el extracto a 420 nm de longitud de onda, 1,4).

Los resultados se muestran en las Figs. 5A y B. El eje horizontal de estos gráficos representa la proporción (% en peso) de materia prima de tabaco de la invención.

40 En los casos en que la materia prima de tabaco de la invención y otra materia prima de tabaco ordinaria se mezclan conjuntamente, en una proporción de generalmente 40% en peso o más, se pueden obtener un valor de a^* y una absorbancia (420 nm) deseables.

Ejemplo de referencia 1

45 La hoja de tabaco curado al aire caliente (FCV) que se había almacenado hasta que la mayor parte de la superficie de la hoja se volvió amarilla, se midió con un colorímetro. Como resultado, el verdor (valor de a^*) de la parte que se volvió amarilla, que representa la mayor parte de la superficie de la hoja, fue $2,0 \pm 0,7$. Cuando esta hoja de tabaco se secó por microondas y se suministró en materia prima de tabaco amarilla, el valor de a^* fue $5,3 \pm 0,1$, y la absorbancia (ABS a 420 nm) fue 1,57.

50 Cuando se produce un cambio de modo que la gran mayoría de la superficie de la hoja de tabaco (60% o más del área de la superficie) tiene un verdor (valor de a^*) mayor que 1,0, la hoja de tabaco se denomina "hoja que se ha

vuelto amarilla"; en otras palabras, los efectos ventajosos de la invención no se obtienen a no ser que al menos la gran mayoría de la hoja de tabaco (60% o más del área de la superficie) tenga un valor de a^* que sea 1,0 o menos.

- 5 Los grados de verdor (valor de a^*) de la hoja de tabaco (hoja de tabaco congelada) antes del secado del tabaco Burley, curado al aire caliente y *N. rustica* usado en los ejemplos experimentales de la invención fueron, respectivamente, los siguientes: Burley, $2,1 \pm 0,3$; curado al aire caliente, $-2,5 \pm 0,6$; *N. rustica*, $-4,6 \pm 0,5$.

Ejemplo de referencia 2

(Método para medir la actividad de la enzima que provoca color marrón enzimático en la materia prima de tabaco)

- 10 Se realizó un experimento en el que, en cuanto a la materia prima de tabaco, para determinar los efectos deseables de incluir una etapa de calentamiento, se midió la enzima que provoca actividades de coloración marrón enzimática en la hoja de tabaco que no se trató térmicamente (una variedad Burley (Michinoku) que se sometió solo a liofilización, una variedad Burley (Burley 21) que se sometió solo a liofilización) y en la materia prima de tabaco que había pasado por las etapas de calentamiento y reducción de humedad según esta invención.

- 15 La medida de la enzima que provoca actividades (PPO) de coloración marrón enzimática en las respectivas materias primas de tabaco se realizó como sigue. La hoja de tabaco se secó hasta un contenido de humedad de 5% en peso o menos, se añadieron 10 mL de un tampón de fosfato potásico 20 mM (pH 6,0) a 200 mg de la muestra molida, y la mezcla se homogeneizó durante 2 minutos en un ambiente refrigerado con hielo. Esto fue seguido por 10 minutos de ultrasonidos en un ambiente refrigerado con hielo, extrayéndose así la proteína enzimática. Esta disolución se filtró usando un filtro de membrana hecho de un material de filtro de acetato de celulosa que tiene un diámetro de poro de 0,20 μm (filtro de acetato de celulosa ADVANTEC). La medida de la actividad PPO se realizó usando esta disolución de proteína enzimática, una disolución tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 6,0), y una disolución de pirocatecol que sirve como sustrato. El procedimiento de medida de la actividad fue como sigue. Una disolución tampón (900 μL) de fosfato potásico 0,1 M y 100 μL de un extracto de proteína enzimática preparado mediante el método descrito anteriormente se mezclaron conjuntamente dentro de una célula de espectrofotómetro de absorción. Como control, se mezclaron conjuntamente 900 μL de una disolución tampón de fosfato potásico 0,1 M y 100 μL de agua desionizada, y esto se usó como referencia. En un ambiente ajustado a 40°C, 1,00 mL de una disolución de pirocatecol 10 mM se mezcló con la muestra y la referencia, y el aumento de absorbancia de luz a 420 nm de longitud de onda con respecto a la referencia se observó a 40°C. La medida implicó medir la tasa de aumento de la absorbancia comenzando inmediatamente después de la adición del sustrato y hasta 15 segundos a 60 segundos después de la adición.

- 30 Las actividades enzimáticas de la hoja de tabaco que no se había tratado térmicamente fueron 4,64 U (hoja liofilizada de una variedad Burley (Michinoku)) y 6,42 U (hoja liofilizada de una variedad Burley (Burley 21)), mientras que la actividad enzimática de la materia prima de tabaco que pasó por las etapas de calentamiento y reducción de humedad fue 0,02 U o menos. Sobre la base de estos resultados, el tratamiento térmico de la hoja de tabaco se puede considerar eficaz para desactivar la PPO.

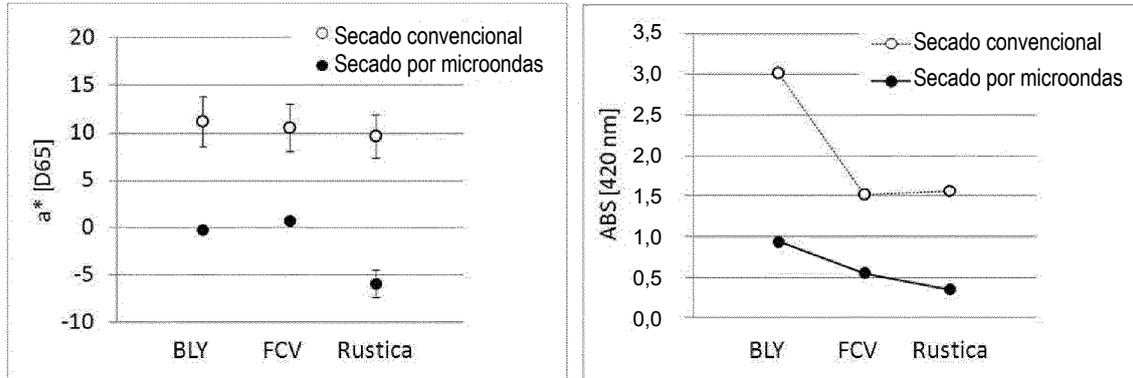
- 35 Aplicabilidad industrial

Debido a que la materia prima de tabaco incluida en el producto de tabaco oral de la invención retiene el color verde de la hoja de tabaco después de la recolección y sus extractos presentan un color claro, se puede evitar la decoloración debida a la filtración del color del producto de tabaco oral en la boca del usuario.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de tabaco oral que comprende una materia prima de tabaco que tiene un valor de a^* , expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de la misma, obtenido usando agua como disolvente de extracción, tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz de 1,0 o menos.
- 5 2. El producto de tabaco oral según la reivindicación 1, en donde la materia prima de tabaco se obtiene mediante un método de tratamiento que incluye: una etapa de calentamiento de la materia prima de tabaco a condición de que se desactive una enzima contenida en ella que provoca el color marrón enzimático; y una etapa de reducción del contenido de humedad de la materia prima de tabaco, en donde el tratamiento de la materia prima de tabaco se realiza después de recolectar las hojas de tabaco que sirven como material de partida para la materia prima de tabaco y antes de que el valor de a^* expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$ sea mayor que 1,0 para el 60% o más de las áreas superficiales de las hojas de tabaco recolectadas, en donde el calentamiento en el método de tratamiento se realiza en condiciones de 80 a 100°C.
- 10 3. El producto de tabaco oral según la reivindicación 2, en donde la etapa de reducir el contenido de humedad de las hojas de tabaco en el método de tratamiento se realiza antes de la etapa de realización del calentamiento, a una presión reducida inferior a 0,1 MPa y una temperatura de 37°C o menos.
- 15 4. El producto de tabaco oral según la reivindicación 2, en donde la etapa de reducir el contenido de humedad de las hojas de tabaco en el método de tratamiento se realiza al mismo tiempo o después de la etapa de realización del calentamiento.
- 20 5. El producto de tabaco oral según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la etapa de realización del calentamiento se realiza mediante calentamiento por vapor, calentamiento por microondas o calentamiento por flujo de gas.
- 25 6. El producto de tabaco oral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proporción en peso de la materia prima de tabaco que tiene un valor de a^* , expresado mediante el método de $L^*a^*b^*$, de 1,0 o menos y un extracto de la misma, obtenido usando agua como disolvente de extracción, tiene a 420 nm de longitud de onda una absorbancia de luz de 1,0 o menos, representa el 40% en peso o más de la materia prima total del tabaco.

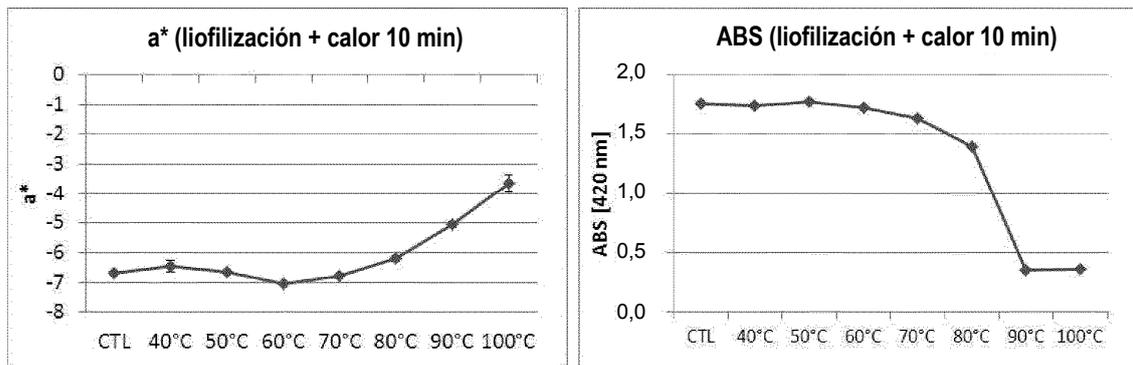
[Fig.1]



(a)

(b)

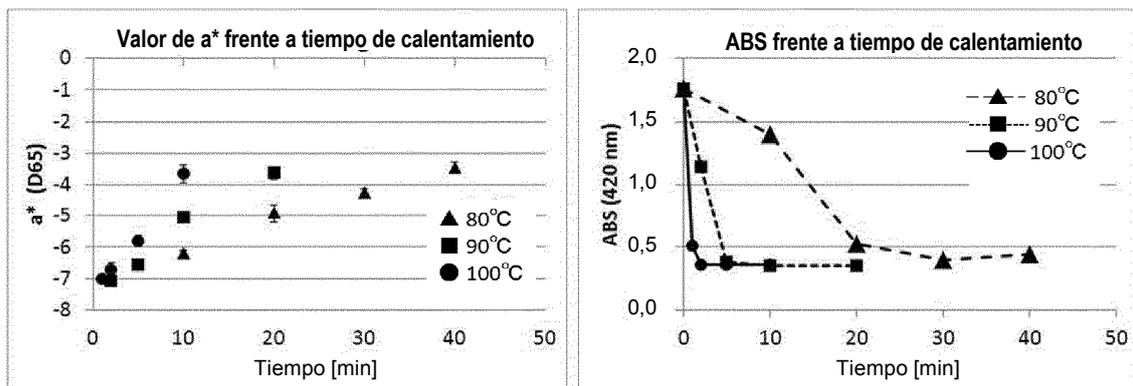
[Fig.2]



(a)

(b)

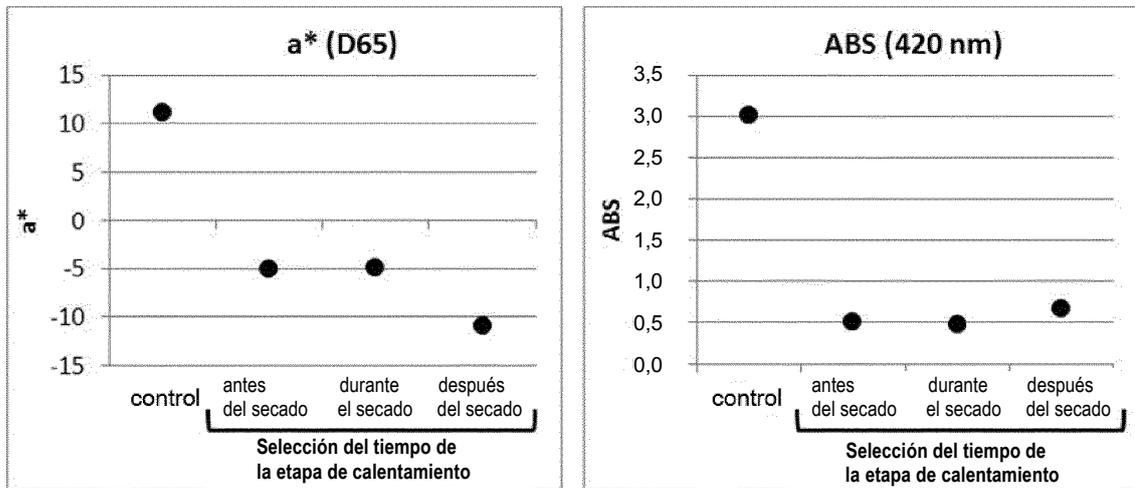
[Fig.3]



(a)

(b)

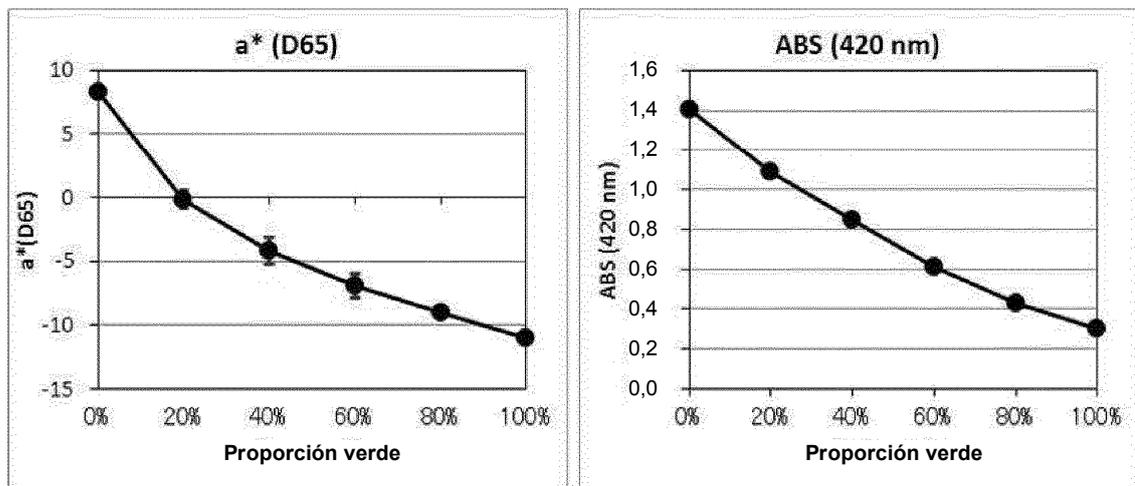
[Fig. 4]



(a)

(b)

[Fig. 5]



(a)

(b)

[Fig. 6]

