



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월23일

(11) 등록번호 10-2329410

(24) 등록일자 2021년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A24B 15/24 (2006.01) **A24B 7/00** (2021.01)

(52) CPC특허분류
A24B 15/245 (2013.01)
A24B 7/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7013448

(22) 출원일자(국제) 2014년12월18일
 심사청구일자 2019년11월21일

(85) 번역문제출일자 2016년05월20일

(65) 공개번호 10-2016-0094941

(43) 공개일자 2016년08월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2014/078607

(87) 국제공개번호 WO 2015/091880
 국제공개일자 2015년06월25일

(30) 우선권주장
 13198191.2 2013년12월18일
 유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌
 CN102920009 A
 US20050279374 A1*
 WO2002037990 A2
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 필립모리스 프로덕츠 에스.에이.
 스위스, 씨에이취-2000, 네우차텔, 쿠아이 얀레나
 우드 3

(72) 발명자
 랭, 게라드
 스위스, 씨에이취-3280 무르텐, 메라츠펠드 58
 살러, 진-피에르
 스위스, 씨에이취-1202 게네베, 세르베테 34
 부아르노즈, 엘린
 스위스, 씨에이취-1745 렌티그니, 엔 메이노우드 27

(74) 대리인
 강철중, 김윤배

전체 청구항 수 : 총 19 항

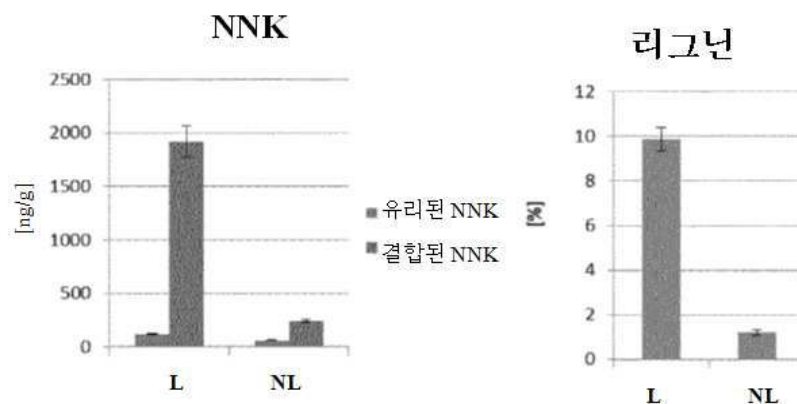
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 담배 식물 재료 내 매트릭스-결합 니코틴-유래된 니트로사민 케톤을 감소시키는 방법

(57) 요약

건조된 담배 식물 재료 내 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하는 건조된 담배 식물 내 매트릭스-결합 NNK의 양을 감소시키는 방법을 제공한다. 건조 전에 내부의 리그닌 함량을 감소시키는 단계를 포함하는, 담배 식물 재료를 건조하는 동안 매트릭스-결합 NNK의 형성을 감소시키는 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 분리하는 단계를 포함하는, 건조된 담배 식물 재료 내 매트릭스-결합 NNK의 양을 감소시키는 방법으로, 여기서 리그닌의 양이 기계적으로 감소되어 있고,

- (a) 건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계;
- (b) 상기 건조된 담배 식물 재료를 처리하여 입자 크기를 감소시키는 단계;
- (c) 상기 건조된 담배 식물 재료 내 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 크기-분리하는 단계; 및
- (d) 단계 (a)에서 제공된 건조된 담배 식물 재료에 비하여 상기 리그닌 양이 감소되고 상기 매트릭스-결합 NNK 양이 감소된 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (a) 다음에 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가적 단계가 있거나; 또는

단계 (a) 다음에 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가 단계가 있고 단계 (c) 다음에 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가 단계가 있는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 방법은 단계 (a) 다음에 측정된 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을 단계 (c) 다음에 측정된 매트릭스-결합 NNK의 수준과 비교하는 추가 단계 (d)를 포함하고 있고, 여기서 단계 (a)에서 제공된 담배 식물 재료에 비하여 단계 (c)에서 얻은 담배 식물 재료 내 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는 담배 식물 재료 내 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되었음을 나타내는, 방법.

청구항 4

담배 식물 재료의 건조 전에 그 내부에 있는 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하고 있는, 담배 식물 재료의 건조 동안에 매트릭스-결합 NNK의 형성을 감소시키는 방법으로,

- (a) 미건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계;
- (b) 상기 미건조된 담배 식물 재료를 처리하여 입자 크기를 감소시키는 단계;
- (c) 건조 단계 이전에 상기 미건조된 담배 식물 재료 내 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 크기-분리하는 단계;
- (d) 단계 (c)에서 제공된 상기 담배 식물 재료를 건조하는 단계; 및
- (e) 상기 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군에 비해 상기 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되어 있는 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 단계 (a) 다음에 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가적 단계가 있거나; 또는

단계 (a) 다음에 상기 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가적 단계가 있으며, 단계 (c) 및 단계 (d) 중 하나 이상의 단계 다음에 상기 적어도 매트릭스-결합 NNK의 양을 측정하는 추가적 단계가 있는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단계 (d) 또는 단계 (e) 다음에 상기 방법은 단계 (a) 다음에 측정된 상기 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을 단계 (c) 및 단계 (d) 중 하나 이상의 단계 다음에 측정된 상기 적어도 매트릭스-결합 NNK의

수준과 비교하는 추가적 단계를 포함하고 있고, 여기서 단계 (a)에서 제공된 상기 담배 식물 재료에 비해 단계 (c) 또는 단계 (d)에서 얻어진 상기 담배 식물 재료 내 상기 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는 상기 담배 식물 재료 내 상기 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되었음을 나타내는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 담배 식물 재료는 비리그닌화 식물 조직을 팽화시키는 처리가 되고, 여기서 상기 팽화된 것과 비팽화된 식물 조직을 이들의 입경차이에 기반하여 분리하여 상기 리그닌의 양이 감소되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 리그닌의 양은 상기 식물 재료로부터 적어도 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 제거하여 감소되는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 제공된 상기 식물 재료는 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하거나 이들로 이루어진, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되었거나 수득가능한 담배 식물 재료로, 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 담배 식물 재료.

청구항 11

재구성 담배 생산 방법으로,

- (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법을 수행하는 단계;
- (b) 단계 (a)에서 수득된 담배 식물 재료를 재구성 담배로 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 재구성 담배를 담배 제품에 통합시키는 단계를 포함하는, 재구성 담배 생산 방법.

청구항 12

제11항에 따른 방법으로 수득되거나 수득될 수 있는 재구성 담배로, 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 재구성 담배.

청구항 13

담배 각초로 사용하기 위한 담배 제조 방법으로,

- (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 방법을 수행하는 단계: 및
- (b) 담배 식물 재료를 담배 각초로 사용하기 위해 말고 절단하는 단계를 포함하는, 담배 제조 방법.

청구항 14

건조된 담배 식물 재료로서, 내부의 리그닌 양이 감소되지 않은 대조군 담배 식물 재료에 비해 감소된 수준의 리그닌을 포함하고 있고, 여기서 건조된 담배 식물 재료 내부의 리그닌 양은 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 분리하여 감소되었고, 여기서 매트릭스-결합 NNK의 양이 3500 ng/g 이하이고,

여기서 유리된 NNK의 양이 330ng/g 미만, 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만, 여기서 니코틴 함량은 2610 µg/g 미만, 또는 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만 및 니코틴 함량은 2610 µg/g 미만이고;

여기서 상기 건조된 담배 식물 재료는 식물 외피층 같은 식물 피층을 포함하거나, 그것으로 이루어지고; 또는

여기서 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들의 조합이 상기 건조된 식물 조직에 실질적으로 부존재하는, 건조된 담배 식물 재료.

청구항 15

제10항에 따른 담배 식물 재료를 포함하거나, 그것으로 이루어지는, 담배 제품으로, 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 담배 제품.

청구항 16

제10항에 따른 담배 식물 재료를 포함하거나, 그것으로 이루어지는, 재구성 담배 제품으로, 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 재구성 담배 제품.

청구항 17

제14항에 따른 건조된 담배 식물 재료를 포함하거나, 그것으로 이루어지는, 담배 제품으로 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 담배 제품.

청구항 18

제14항에 따른 건조된 담배 식물 재료를 포함하거나, 그것으로 이루어지는, 재구성 담배 제품으로, 상기 담배 식물 재료의 평균 입자 크기는 0.5 mm 초과인, 재구성 담배 제품.

청구항 19

적어도 두 개의 서로 다른 유형의 담배를 배합하여 담배 배합물을 형성하는 담배 배합 방법으로서,

- (a) 제1 건조된 담배 식물 재료를 제공하고, 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 분리하여 내부의 리그닌 양을 감소시키는 단계;
- (b) 상기 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상을 측정하고, 단계 (a)에서 제공된 상기 제1 건조된 담배 식물 재료에 비해 상기 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상이 감소되어 있는 건조된 담배 식물 재료를 선택하는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에서 얻은 상기 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상 보다 많은 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상을 가진 제2 건조된 담배 식물 재료를 제공하고, 상기 제2 건조된 담배 식물 재료의 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상을 측정하는 단계;
- (d) 상기 단계 (b)와 (c)로부터의 상기 제1 및 제2 건조된 담배 식물 재료를 함께 배합하고, 상기 배합된 담배 식물 재료의 상기 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- (e) 상기 배합된 담배 식물 재료의 상기 총 NNK 함량 및 매트릭스-결합 NNK 함량 중 하나 이상이 단계 (c)에서 제공된 상기 제2 건조된 담배 식물 재료보다 적은 배합된 담배 식물 재료를 얻는 단계를 포함하고, 여기서 단계 (a)와 (b)는 단계 (c) 후에 수행되는, 담배 배합 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 일반적으로 담배 식물 재료 내의 니코틴-유래된 니트로사민 케톤 또는 4-(메틸니트로사미노)-1-(3-피리딜)-1-부타논(NNK)의 양을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

담배 제품의 제조 및 가공 동안에, 부산물 - 예컨대 담배 줄기, 및 잎 스크랩-이 생산된다. 예를 들어, 제조 공정으로부터의 담배 줄기와 담배 미분(tobacco fine)은 담배 제품의 제조에 직접 사용하기에 부적합하다. 줄기와 미분은 원재료 투자의 상당한 양을 대변하기 때문에, 허용 가능한 가공된 담배 잎과의 혼합물에서 상대적으로 많은 양으로 나중에 사용할 수 있게 되는 재구성 담배 재료(예, 재구성 담배 시트) 같은 제품으로 이러한 줄기와 미분을 더 변환하기 위한 공정이 개발되어 있다. 재구성 담배(reconstituted tobacco)는 슬러리 제조 또는 주조 시트 공정에서 제조될 수 있는데, 여기서 으갠 담배 줄기 펄프와 담배 잎의 다른 부분은 분쇄되고 다른 첨

가제를 함유할 수도 있는 용액과 혼합된다. 그리고 나서, 얻어진 담배 슬러리를 분무해서 박막을 형성하고, 건조하고, 말고 및 충전제에 첨가되는 스트립으로 썬다(dice).

[0003] 니트로사민(Nitrosamine)은 담배, 식품 및 화장품과 같은 다수의 소비재에서 발견되는 유기 화합물이다. 이 클래스의 화합물 중 일부는 실험 동물에서 발암성인 것으로 나타났기 때문에 니트로사민은 강하게 과학적인 관심을 끌어들였다. 공기-건조(air-cured) 및 열-건조(flue-cured) 담배가 무연 담배, 퀴린의 주류연 및 부류연에서 발견될 수 있는 담배 특이 니트로사민(tobacco specific nitrosamine)을 함유하는 것으로 보고되어 있다. 담배에서, 네 종의 니트로사민이 상당한 양으로 생산된다. 이들은 4-(메틸니트로사미노)-1-(3-피리딜)-1-부타논(NNK), N-니트로소니코틴(NNN), N-니트로소아나타빈(NAT) 및 N-니트로소아나바신(NAB)이다. 담배 특이 니트로사민은 생장중인 담배 식물 또는 신선한 살 담배 (녹색 담배)에서는 상당량 존재하는 것으로 간주되고 있지 않지만, 담배 건조 공정 동안 형성될 수 있다. 녹색 잎의 건조 공정 동안 담배 특이 니트로사민이 형성되는 것과 더불어, 담배 특이 니트로사민은 수성 담배 슬러리를 제조하는데 사용되는 공정 - 예컨대 재구성 담배를 제조하는데 사용되는 공정 동안 형성될 수도 있다.

[0004] 담배 특이 니트로사민을 감소시키기 위한 시도로, 방사선 처리, 화학적 처리 및 추출을 포함하여 담배 식물 또는 재배된 담배 잎의 다양한 처리가 제안되었다. 담배 특이 니트로사민을 감소하기 위한 다른 방법은 MacKown 등 (1988) J. Agric. Food Chem. 36, 1031-1035에 의해 제안되었다. 이러한 방법들은 살균, 미생물 억제제, pH 증가를 위한 염기, 또는 재구성 담배 시트의 제조 동안 담배 특이 니트로사민의 축적을 감소시키기 위한 아스코르브산을 사용하는 처리와 연관된다. WO2012160133은 특히 상승된 수준의 니트로사민이 상승된 아질산염 수준에 의해 생성될 때, 그 pH를 증가시켜서 담배 균질물 속 담배 특이 니트로사민의 수준을 감소시키는 방법을 설명하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 담배에서 담배 특이 니트로사민의 수준을 감소시키기 위한 시도에 있어서의 한 가지 문제는, NNK를 포함하여, 공기-건조 담배에서 니트로사민 일부가, 제거 또는 추출하기 어려울 수 있는 결합 또는 매트릭스-결합(matrix-bound) 형태로 존재한다는 점이다. 매트릭스-결합 NNK는 물로 세척된 버얼리종 충전제로부터 0.1N KOH 용액으로 추출할 수 있다. 이 알칼리 처리는 연기 속 NNK 수준을 감소시킨다(Keene, C.K., 1992, The Effect of Base Digestion on TSNA in Extractables-Depleted Fillers. Legacy Tobacco Documents). 그러나, 상기 처리는, 독성학적으로 관련 화합물을 담배 속으로 도입할 수 있고, 담배의 품질을 유의하게 저하시킬 수 있으며, 이는 담배 산업에 있어서 심각한 문제이다.

[0006] WO2010/021809는, 담배의 질소 화합물과 리그닌을 재건조하는 방법을 개시하고 있다. 질소 화합물은 용매 추출에 의해 제거되고, 리그닌은 별도의 단계에서 제거된다.

과제의 해결 수단

[0007] 담배 건조 동안 형성되는 매트릭스-결합 NNK를 감소시키기 위해 효과적이며 비용 효율적인 방법이 필요하다. 구체적으로, 독성 또는 잠재적 독성 화합물을 도입하지 않으며 담배 제품의 품질을 열화시키지 않는 건조된 담배의 매트릭스-결합 NNK의 수준을 감소시키기 위한 비용 효과적이며 간단한 방법이 특히 바람직하다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은, 리그닌화(L) 및 비리그닌화(NL) 조직에 있어서, 건조된 버얼리종 주맥 또는 건조된 버얼리종 줄기의 유리된 NNK, 매트릭스-결합 NNK 및 리그닌의 분포를 도시하는 그래프.

도 2는 리그닌화(L) 및 비리그닌화(NL) 조직들을 도시하는 수화 건조된 버얼리종 줄기의 단면도이다. 리그닌화 조직은 플로로글루시놀에 의해 붉은 색으로 염색되어 있다.

도 3은 아질산나트륨 용액 (실온에서 4시간 동안 1.5mL(물 내의 10mg/mL)을 셰이킹함)에 의한 니트로소화 후의 녹색 버얼리종 주맥의 리그닌화(L) 및 비리그닌화(NL) 조직에서의 유리된 NNK, 매트릭스-결합 NNK, 및 리그닌의 분포를 도시한 그래프이다.

도 4는 지상 동결 건조된 버얼리종 담배 식물 줄기의 사별(sieving) 부분에서의 유리된 NNK 및 매트릭스-결합 NNK를 도시한 그래프이다.

도 5는 지상 동결 건조된 버얼리종 담배 식물 줄기의 사별 일부에서의 매트릭스-결합 NNK와 리그닌 간의 상관을 도시한 그래프이다.

도 6은, TN90의 녹색 주맥의 세척과 니트로소화 후의 후막 조직(S)과 주맥의 외층(NS)에서의 매트릭스-결합 NNK의 농도($\mu\text{g/g}$)를 도시한 그래프이다. 의사-옥시니코틴(PON)($\mu\text{g/g}$)과 니코틴($\mu\text{g/g}$)의 수준도 도시되어 있다. 상업적으로 건조된 버얼리종 줄기 샘플의 리그닌화(CS) 및 비리그닌화(CNS) 부분에서의 매트릭스-결합 NNK 수준(ng/g)도 도시되어 있다. NNN(ng/g)와 니코틴($\mu\text{g/g}$)의 수준도 도시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 본 발명은, 매트릭스-결합 NNK가 담배 식물의 리그닌과 공동 위치지정(localise)되어 있는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 기초한다. 구체적으로, 본 발명자들은, 줄기와 주맥 같은 담배 식물의 건조된 부분들 내에서, 매트릭스-결합 NNK가, 특히, 피층 같은 둘러싸고 있는 조직이 아니라 관다발(예를 들어, 물관부) 내의 리그닌화 조직 같은 리그닌과 공동 위치지정되거나 리그닌에 의해 지배적으로 공동 위치지정되거나 리그닌과 함께 배타적으로 공동 위치지정되는 것을 관찰하였다. 따라서, 리그닌을 제거(예를 들어, 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 부분을 분리하여)하여, 식물 재료 내의 매트릭스-결합 NNK 및 그 대사물질의 양을 감소시킬 수 있다. 매트릭스-결합 NNK는 리그닌에 공유 또는 비공유 결합될 수 있다. 식물 재료는, NNK 수준이 감소되고 감각 특성이 잠재적으로 개선된 연기를 전달하는 것으로 예상된다. 본 발명은, 매트릭스-결합 NNK를 축적하거나 매트릭스-결합 NNK를 축적하는 잠재력을 갖는 식물 재료에 적용될 수 있다. 특히, 본 발명은 일부 담배 공정에서 사용되는 매트릭스-결합 NNK를 포함하는 저가 식물 재료에 적용될 수 있다. 본원에서 설명하는 방법들은, 임의의 첨가제를 사용하지 않고서 실시할 수 있으며, 이에 따라 독성학적으로 관련 화합물을 식물 재료에 추가로 도입하지 않는다. 리그닌은, 담배 식물 재료의 건조 동안 또는 건조 후에 제거될 수 있다. 리그닌은, 리그닌과 공동 위치지정되는 매트릭스-결합 NNK를 방지, 감소, 또는 억제하도록 건조 전에 제거될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 한 가지 일반적인 목적은, 다른 수단에 의한 흡연 또는 소모를 위한 담배 내의 매트릭스-결합 NNK 및 그 대사물질의 양을 실질적으로 감소시키는 것이다. 또 다른 일반적인 목적은 쥘렌(cigarettes), 엽쥘렌(cigars), 씹는 담배(chewing tobacco), 코담배(snuff)를 포함한 담배 제품과 담배 함유 껌과 사탕의 발암 가능성을 감소하는 것이다. 또 다른 일반적인 목적은, 담배 재료와 담배 제품 내의 매트릭스-결합 NNK 및 그 대사물질의 양을 감소 또는 저감하는 것이다. 또 다른 일반적인 목적은, 부분적으로 또는 완전히 건조된 같은 건조된 담배 재료 내의 매트릭스-결합 NNK 및 그 대사물질의 양을 감소시키는 것이다. 또 다른 일반적인 목적은 연기를 포함하는 에어로졸 내의 NNK 및 그 대사물질의 양을 감소시키는 것이다. 아울러 본 발명의 또 다른 목적은, NNK 또는 그 대사물질의 감소된 양을 함유하는 인간 소비에 적절한 담배 제품을 제공하여, 소정의 형태의 담배를 흡연, 소비, 또는 그 외에는 삼키는 인간의 NNK 또는 그 대사물질의 양을 감소시키고, 이에 따라 이러한 담배 제품의 발암 가능성을 감소시키는 것이다.
- [0011] 일 측면에서는, 리그닌화 부분을 비리그닌화 조직으로부터 분리하여 담배 재료의 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료에 있어서 매트릭스-결합 NNK의 양을 감소시키는 방법을 제공하고 있으며, 바람직하게, 여기서 리그닌의 양은 화학적으로 및/또는 기계적으로 감소된다.
- [0012] 한 구현예에서, 담배 식물 또는 담배 식물 재료는, 비리그닌화 식물 조직을 팽화시키도록 처리된다. 리그닌화 조직의 양은, 팽화된 식물 조직과 비팽화된 식물 조직을 이들의 밀도차이(예를 들어, 부유 밀도) 및/또는 이들의 강도차이 및/또는 이들의 크기차이 및/또는 이들의 중량차이에 기초하여 분리하여 감소된다. 팽화된 식물 조직은 추가 담배 처리를 위해 수집될 수 있다.
- [0013] 리그닌화 조직들을 분별하여 NNK 및 연관된 TSNA의 수준이 상당히 감소될 수 있음을 관찰하였다. 질소 화합물 및/또는 리그닌의 별도의 화학적 추출은 필요하지 않다.
- [0014] 한 구현예에서, 리그닌의 양은, 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 식물 또는 식물 재료로부터의 이들 중 두 개 이상의 조합을 제거하여 감소된다. 리그닌은 관다발 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 관다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은, 주변 조직이 아니라 관다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 물관부 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 주변 조직이 아니라 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 후벽 조직 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 주변 조직이 아니라 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌화 조직은 일반적으로 식물 주맥의 외층에는 없다.
- [0015] 한 구현예에서, 본 발명에 따라 처리되는 식물 또는 식물 재료는, 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는

이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하고 있거나 이들로 이루어지거나 이들로 본질적으로 이루어진다.

- [0016] 한 구현예에서, 리그닌의 양은, 식물 또는 식물 재료로부터 외피층 같은 피층을 채취하여 감소된다.
- [0017] 한 구현예에서, 상기 방법은, (a) 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계; (b) 담배 식물 재료를 분별하여 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양을 감소시키는 단계; 및 단계 (c) (a)에서 제공되는 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료에 비해 리그닌의 양이 감소되어 있고 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되어 있는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계를 포함하고 있다.
- [0018] 한 구현예에서, 단계 (a)에 이어서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 측정하는 단계가 더 있으며, 선택적으로, (b) 단계에 이어서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 측정하는 단계가 더 있다.
- [0019] 한 구현예에서, 상기 방법은, (d) 단계 (a)에 이어서 측정된 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을 (b) 단계에 이어서 측정된 NNK의 수준과 비교하는 단계를 포함하고, 단계 (a)에서 제공되는 담배 재료에 비해 (b) 단계에서 얻은 담배 재료의 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는, 담배 재료의 매트릭스-결합 NNK가 감소되어 있음을 나타낸다.
- [0020] 추가 측면에서는, 건조 전에 담배 식물 또는 담배 재료 내에 있는 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하는, 담배 식물 또는 담배 식물 재료의 건조 동안 매트릭스-결합 NNK의 형성을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0021] 한 구현예에서, 상기 방법은, (a) 미건조된 담배 식물 또는 미건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계; (b) 건조 전에 미건조된 담배 식물 또는 미건조된 담배 식물 재료 내 리그닌의 양을 감소시키는 단계; (c) (b) 단계에서 제공되는 담배 식물 또는 담배 식물 재료를 건조시키는 단계; 및 (d) 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군에 비해 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되어 있는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계를 포함하고 있다.
- [0022] 한 구현예에서, 단계 (a)에 이어서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 측정하는 추가 단계가 있으며, (b) 단계에 이어서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 측정하는 추가 단계가 있고, 선택적으로, 단계 (c)에 이어서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 측정하는 추가 단계가 있다.
- [0023] 한 구현예에서, 단계 (c) 또는 (d) 단계에 이어서, 상기 방법은, 단계 (a)에 이어서 측정된 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을 (b) 단계 및/또는 단계 (c)에서 이어서 측정된 NNK의 수준과 비교하는 추가 단계를 포함하고, 단계 (a)에서 제공되는 담배 재료에 비해 (b) 단계 또는 단계 (c)에서 얻어지는 담배 재료의 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는, 담배 재료의 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소됨을 나타낸다.
- [0024] 추가 측면에서는, 본원에 기재된 방법(들)에 의해 수득되었거나 수득 가능한 담배 식물 재료가 제공되어 있다.
- [0025] 추가 측면에서는, 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소된 담배를 제조하도록 담배 식물 또는 담배 식물 재료의 리그닌의 양이 대조군 담배 식물 또는 대조군 담배 재료에 비해 감소된 담배 식물 또는 담배 식물 재료의 용도를 제공하고 있으며, 상기 매트릭스-결합 NNK의 수준은 대조군에 비해 감소되어 있다.
- [0026] 추가 측면에서는, 재구성된 담배를 생산하는 방법이 제공되어 있는데, (a) 본원에 설명된 방법(들)을 수행하는 단계; (b) 단계 (a)에서 얻은 담배 재료를 재구성된 담배로 제조하는 단계; 및 (c) 선택적으로, 재구성된 담배를 담배 제품에 통합하는 단계를 포함하고 있다.
- [0027] 추가 측면에서는, 본원에 기재된 방법에 의해 수득되었거나 수득 가능한 재구성 담배가 제공되어 있다.
- [0028] 추가 측면에서는, 담배 각초로서 사용하기 위한 담배 제조 방법이 제공되어 있는데, (a) 본원에서 설명된 방법(들)을 수행하는 단계; 및 (b) 담배 각초로서 사용하기 위한 담배 재료를 말고 절단하는 단계를 포함하고 있다.
- [0029] 추가 측면에서는, 리그닌의 양이 감소되지 않은 대조군 담배 식물 재료에 비해 감소된 수준의 리그닌을 함유하는 건조된 담배 식물 재료를 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 약 3500ng/g 이하이다.
- [0030] 한 구현예에서, 평균 입자 크기는 약 0.5mm 초과이다.
- [0031] 한 구현예에서, 유리된 NNK의 양은 약 330ng/g 미만이고, 선택적으로, NNN 함량은 약 1700ng/g 미만이며, 선택적으로, 니코틴 함량은 약 2610 μ g/g 미만이다.

- [0032] 한 구현예에서, 건조된 담배 식물 재료는, 식물 외피층 같은 식물 피층을 포함하고 있고, 이러한 피층으로 이루어지거나 본질적으로 이루어진다.
- [0033] 한 구현예에서, 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합이, 건조된 담배 식물 재료에 실질적으로 부존제한다.
- [0034] 한 구현예에서, 건조된 담배 식물 재료는, 식물 외피층 같은 식물 피층을 포함하고 있거나, 이루어지거나 본질적으로 이루어지며, 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합은 실질적으로 건조된 담배 식물 재료에 부존제한다.
- [0035] 한 구현예에서, 건조된 담배 식물 재료는, 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는 이들 중 두 개 이상의 조합으로부터 얻어지거나 얻을 수 있다.
- [0036] 한 구현예에서, 평균 입자 크기는 약 0.5mm 초과이다.
- [0037] 한 구현예에서, 유리된 NNK의 양은 약 330ng/g 미만이다.
- [0038] 한 구현예에서, NNN 함량은 약 1700ng/g 미만이다.
- [0039] 한 구현예에서, 니코틴 함량은 약 2610 μ g/g 미만이다.
- [0040] 추가 측면에서는, 본원에서 설명하는 식물 재료 또는 건조된 식물 재료를 포함하고 있거나, 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 이루어져 있는, 담배 제품 또는 재구성된 담배 제품을 제공하고 있다.
- [0041] 추가 측면에서는, 대조군 에어로졸에 비해 NNK의 양이 감소되어 있는 에어로졸을 생성하는 방법을 제공하고 있으며, 이 방법은, (a) 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계; (b) 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내 리그닌의 양을 감소시키는 단계; (c) 단계 (a)에서 제공되는 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료에 비해 리그닌의 양이 감소되어 있고 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되어 있는 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계; 및 (d) 단계 (c)로부터의 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 가열하여 에어로졸을 발생시키는 단계를 포함하고 있다.
- [0042] 추가 측면에서는, 대조군 에어로졸에 비해 NNK의 양이 감소되어 있는 에어로졸을 생성하는 방법을 제공하고 있으며, 이 방법은, (a) 미건조된 담배 식물 또는 미건조된 담배 식물 재료를 제공하는 단계; (b) 건조 전에 미건조된 담배 식물 또는 미건조된 담배 식물 재료 내 리그닌의 양을 감소시키는 단계; (c) 단계 (b)에서 제공된 담배 식물 또는 담배 식물 재료를 건조시키는 단계; (d) 리그닌의 양이 감소되지 않은 대조군에 비해 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소된 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 얻는 단계; 및 (e) 단계 (d)로부터의 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 가열하여 에어로졸을 발생시키는 단계를 포함하고 있다.
- [0043] 추가 측면에서는, 대조군 에어로졸에 비해 NNK의 양이 감소되어 있는 에어로졸을 발생시키는 방법을 제공하고 있으며, 이 방법은, (a) 본원에서 설명하는 방법들에 의해 얻어진 또는 얻어질 수 있는 담배 식물 재료 또는 건조된 식물 재료를 포함하고 있거나, 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 이루어져 있는 담배 제품 또는 재구성된 담배 제품을 제공하는 단계; 및 (b) 담배 제품 또는 재구성된 담배 제품을 가열하여 에어로졸을 발생시키는 단계를 포함하고 있다.
- [0044] 추가 측면에서, 본원에 기재된 방법(들)에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 에어로졸이 제공되어 있다.
- [0045] 추가 측면에서는, 담배 식물 피층으로 본질적으로 이루어져 있는 건조된 담배 재료를 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 본원에서 설명하는 바와 같이 감소된다.
- [0046] 추가 측면에서는, 담배 배합물을 형성하도록 적어도 두 개의 서로 다른 유형의 담배가 배합되는, 담배를 배합하는 방법을 제공하고 있으며, 이 방법은, (a) 제1 건조된 담배 식물 재료를 제공하고 제1 건조된 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양을 감소시키는 단계; (b) 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정하고, 단계 (a)에서 제공된 제1 건조된 담배 식물 재료에 비해 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량이 감소되어 있는 건조된 담배 재료를 선택하는 단계; (c) 단계 (b)에서 얻은 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK보다 더 많은 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 가진 제2 건조된 담배 식물 재료를 제공하고, 선택적으로, 제2 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정하는 단계; (d) 단계 (b)와 (c)로부터 제1 및 제2 건조된 담배 식물 재료를 함께 배합하고, 선택적으로, 배합된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정하는 단계; 및 (e) 배합된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스 NNK 함량이 단계 (c)에서 제공되는 제2 건조된 담배 식물 재료보다 적은 배합된 담배 식물 재료를 얻는 단계를

포함하고, 선택적으로, 단계 (a)와 (b) 는 단계 (c) 후에 수행된다.

- [0047] 추가 측면에서, 본원에 기재된 방법(들)에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 배합된 담배 식물 재료가 제공되어 있다.
- [0048] 상기에서 논의한 구현예들 각각은 본 발명의 측면들 각각의 구현예들로서 개시되어 있다. 하나 이상의 구현예들의 조합이 고려된다.
- [0049] 본 출원의 범위 내에서 사용되는 기술적인 용어들 및 표현들은 식물 및 분자 생물학의 관련된 분야에서 통상적으로 적용되는 의미가 일반적으로 주어져야 한다. 모든 이하의 용어 정의는 본 출원의 완전한 내용에 적용된다.
- [0050] 용어 "포함하는(comprising)"은 다른 요소 또는 단계를 배제하지 않고 부정관사 "a" 또는 "an"는 복수를 배제하지 않는다.
- [0051] 속성 또는 값과 관련하여 용어 "본질적으로", "약", "대략" 기타 등등은 특히 정확하게 그 속성 또는 정확하게 그 값을 각각 정의하기도 한다.
- [0052] 용어 "식물"은 수명 주기 또는 발생(development) 중 임의의 단계의 임의의 식물 또는 그 일부, 및 그의 후손을 의미한다. 한 구현예에서, 식물은 "담배 식물"로서, 니코티아나(Nicotiana) 속에 속하는 식물을 의미한다. 바람직한 담배 식물 종들이 본원에서 기재되어 있다.
- [0053] "식물 세포"는 식물의 구조적 및 생리학적 단위를 의미한다. 식물 세포는 세포벽이 없는 원형질체, 단리된 단일 세포 또는 배양된 세포 형태일 수도 있고, 또는 이들에 한정하는 것은 아니지만 식물 조직, 식물 기관, 또는 전체 식물과 같은 보다 조직화된 단위의 일부분으로서일 수도 있다. 한 구현예에서, 식물 세포는 담배 식물 세포이다.
- [0054] 용어 "식물 재료"는 담배 식물 또는 다양한 담배 식물의 혼합물의 어느 부분을 의미하며 제한하지 않고 식물 조직, 잎 스크랩, 녹색 잎 스크랩, 줄기, 식물 가공 도중에 생성된 분진, 및 잎 주 박층 조각 및 이들의 조합을 포함하고 있다. 소정의 구현예들에서, 식물재료는 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는 이들의 혼합물 또는 이들 중 두 개 이상의 조합 같은 리그닌을 포함하고 있는 식물 일부분, 또는 식물부분들의 혼합물을 포함하고 있거나, 이루어져 있거나, 본질적으로 이루어져 있을 것이다. 담배 식물 재료는 가공된 담배 부분 또는 조각의 형태, 본질적으로 천연 박층 또는 줄기 형태의 비건조된, 건조된, 또는 숙성된 담배, 담배 추출물 또는 전술한 혼합물, 예를 들어, 추출된 담배 펄프와 과립화되고 건조되고 숙성된 천연 담배 박층을 결합시킨 혼합물을 가지고 있을 수 있다. 식물 재료는 고품형, 액형, 반고형, 지형, 파쇄형, 사별형, 또는 미립형 등 기타 입정을 감소시키는 처리된 형태일 수 있다. 담배 재료는 이에만 한정되지 않지만, 절단 또는 연마, 또는 이들의 조합을 포함한, 균질화를 거치고 난 균질물의 형태일 수 있다. 균질물은 균질화를 거치고 난 전체 식물 또는 리그닌을 포함하는 식물 부분, 예를 들어, 주맥 또는 줄기 또는 대 또는 이들의 2 이상의 조합의 혼합물과 같은 식물 요소들의 혼합물로부터 얻어질 수 있다. 상기 식물 재료는 담배 재료의 현탁액 또는 수성 용액 또는 용매 내의 담배 균질물을 포함한, 슬러리 형태일 수 있다. 상기 슬러리는 수성 용액 또는 용매 중의 5%(w/v), 10%(w/v), 15%(w/v), 20%(w/v) 또는 25%(w/v) 또는 그 이상의 식물 혼합물일 수 있다. 한 구현예에서, 식물 재료는, 리그닌화 조직 같은 리그닌을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있는 식물 재료이다. 한 구현예에서, 식물 재료는, 관다발을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있는 식물 재료이다. 한 구현예에서, 식물 재료는, 물관부를 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있는 식물 재료이다. 한 구현예에서, 식물 재료는, 리그닌화 후벽 조직을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있는 식물 재료이다. 한 구현예에서, 식물 재료는, 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있는 식물 재료이다. 한 구현예에서, 식물 재료는 담배 식물 재료다.
- [0055] 용어 "담배 제품"은 흡연 또는 흡연가능한 물품 및 무연 담배 제품을 포함하고 있다.
- [0056] 용어 "유리된 NNK"는 실온에서 수성 완충제(들)로 상기 식물 재료를 추출하여 얻어진 추출물의 NNK 함량으로부터 계산된 NNK 농도를 의미한다. 그러한 추출물 내 NNK 함량은 초고성능 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석기(UPLC-MS/MS)를 사용하여 결정된다.
- [0057] 용어 "총 NNK"는 추출 혼합물이 본원에 기재된 방법(예를 들어, 약 4 시간 동안 약 130℃로 가열)을 거치고 추출물의 표본을 여과한 후 계산된 NNK 농도를 의미한다. 그러한 추출물 내 총 NNK 함량은 UPLC-MS/MS를 사용하여

결정될 수 있다.

- [0058] 본원에서 사용되는 바와 같은 "결합 NNK" 또는 "매트릭스-결합 NNK"라는 용어는, "총 NNK"와 "유리된 NNK" 농도 간의 차이를 나타낸다.
- [0059] 용어 "저감된 리그닌 함량" 또는 "감소된 리그닌 함량" 또는 "비리그닌화" 이들의 문법적 변형들은, 비교가능한 대조군 식물의 리그닌의 양과 비교할 때 식물의 리그닌의 양에 있어서 측정가능한 정량적 감소를 나타낸다. 리그닌의 정량적 감소는, 당업계에서 공지되어 있으며 클라슨 리그닌 분석(Method in Enzymol., 161:87-101 (1988)), 아세틸 브로마이드 분석(Wood Sci. Technol., 22:271-280 1988)) 또는 티오글리콜산에 의한 유도체화에 기초한 광도 측정법에 의해 쉽게 확인할 수 있다. (J. Chem. Ecol., 28, 2483-2501 (2002)). 비리그닌화 조직에 있어서, 리그닌의 양은 비교가능한 대조군 식물에 비해 감소되고, 리그닌의 양은 완전하게, 실질적으로 또는 부분적으로 제거될 수 있다. 비리그닌화 조직에 있어서, 검출가능한 양의 리그닌은, 리그닌의 양이 제거되지 않은 비교가능 대조군 식물에 비해 리그닌의 양에서 측정가능한 정량적 감소가 있다고 한다면, 존재할 수 있다. 비리그닌화 조직에서는, 임의의 양의 리그닌을 검출하지 못할 수도 있다. 비리그닌화 조직은, 식물 또는 리그닌이 제거된 식물 일부 내 리그닌의 총 건식 중량의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만을 함유할 수 있다.
- [0060] "대조군 식물" 또는 "대조군 식물 세포"는, 조작 또는 개질되지 않은 리그닌 함량 및/또는 NNK 함량을 갖는, 천연 또는 자연적으로 발생하는 식물 또는 식물 세포 같은 식물 또는 식물 세포를 가리킨다. 대조군 식물 재료는, 대조군 식물 또는 대조군 식물 세포 또는 이들의 조합으로부터 얻어지거나, 유도되거나, 또는 유도가능한 식물 재료를 포함하고 있다. 대조군 식물 또는 대조군 식물 세포는, 동일한 유형의 식물 또는 식물 세포일 수 있으며, 예를 들어, 비교되고 있는 식물 또는 식물 세포와 동일한 종의 식물 또는 식물 세포일 수 있다. 대조군 식물은 야생형 식물 또는 야생형 식물 세포에 해당할 수 있다.
- [0061] 용어 "저감되다" 또는 "감소되다" 또는 이의 문법적 변형은, 약 10% 내지 약 99%의 감소, 또는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 100% 또는 그 이상의 양, 총량 또는 활성의 감소를 의미한다.
- [0062] 용어 "억제하다" 또는 이의 문법적 변형은 약 98% 내지 약 100%의 감소, 또는 적어도 98%, 적어도 99%, 특히 100%의 양, 총량, 또는 활성의 감소를 의미한다.
- [0063] 용어 "증가하다" 또는 이의 문법적 변형은 양, 총량 또는 활성에 대해, 약 5% 내지 약 99%의 증가, 또는 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 100% 또는 그 이상의 증가를 의미한다.
- [0064] 용어 "약"은 주어진 숫자 값 또는 범위의 맥락에서 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 10% 이내, 또는 5% 이내인 값 또는 범위를 의미한다.
- [0065] 용어 "적어도 일부" 또는 이의 문법적 변형은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%의 양, 총량, 또는 활성을 의미한다.
- [0066] 일반적으로, 본 발명의 개시내용은 NNK 또는 이의 대사물 또는 이의 형성될 수 있거나 형성된 혼합물이 있는 임의의 형태의 담배 식물 재료에 적용될 수 있다. 적절하게는, 적어도 일부의 NNK가 결합된 형태이다. 적어도 일부의 매트릭스 결합 형태가 리그닌화 조직과 같은 리그닌과 공동 위치지정되어 있다. 유리된 니트로사민(들) 및 매트릭스 결합 니트로사민(들)을 측정하기 위한 방법들이 당 기술분야에 주지되어 있고 본 명세서에 설명되어 있다. 간략하게, 담배 샘플의 부분 표본(aliquot)을 추출할 수 있고 그 안의 니트로사민 함량은 초고성능 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 측정기(UPLC-MS/MS)를 사용하여 분석될 수 있다. 통상적으로, 정량화되어 있는 하나 이상의 니트로사민에 대응하는 하나 이상의 표준이 담배 샘플의 부분 표본에 합체될 수 있을 것이다. 추출물로부터 계산된 샘플 농도는 샘플 내의 "유리된 NNK" 농도에 대응한다. 본원에서 설명되어 있는 방법들 (예를 들어, 약 4시간 동안 약 130℃로 가열하여)로 추출 혼합물을 처리한 후, 니트로사민 농도가 UPLC-MS/MS 에 의해 재차 측정된다. 이들 값들로부터, 샘플 내의 "총 NNK" 농도가 계산될 수 있다. "매트릭스 결합 NNK" 농도는 "총 NNK" 농도와 "유리된 NNK" 농도 간의 차이이다.
- [0067] 많은 연구가 담배에 대해, 특히 담배-특이 니트로사민과 관련하여 수행되어 있다. 갓 수확한 담배 잎은 "녹색

담배(green tobacco) "라고 지칭되며, 니트로사민을 함유하지 않는다고 여겨지지만, 녹색 담배는 인간이 소비하기에 적절하지 않다. 녹색 담배를 건조하는 공정은 수확된 담배의 종류에 의존한다. 예를 들어, 버지니아 플루(Virginia flue)(bright) 담배는 통상적으로 열건되며, 버얼리(Burley) 및 특정 다크 종은 보통 공기-건조한다. 담배의 열건(flue-curing)은 통상적으로 한달 내지 두달 동안의 공기-건조형과 비교해서 5일 내지 7일의 기간에 걸쳐서 행해진다. 대부분의 화학적 생화학적 변화가 건조 공정 동안에 시작되고 일 건조의 초기 단계에 걸쳐서 계속된다. 담배의 황색으로부터 갈색으로의 점진적 색 변환은 일반적으로 니트로사민의 형성 및 실질적인 축적과, 증가된 미생물 함량에 기인한다. NNK를 포함한 담배-특이 니트로사민이 형성되는 정확한 기작은 분명하지 않지만, 건조 공정 동안에 아질산염의 발생에 있어서 미생물 질산 환원 효소를 포함하는, 미생물 활성화에 의해 향상된다고 여겨진다.

[0068] 전술한 바와 같이, 매트릭스-결합 NNK는, 담배 식물 또는 담배 식물 재료에 있어서 리그닌과 함께 공동 위치지정되는 것으로 발견되었다. 리그닌은, 4-히드록시페닐프로파노이드의 산화적 조합 결합으로부터 발생하는 방향족 중합체들의 많은 작용기에 대한 일반적 용어이다. 이러한 중합체들은, 단단하고도 불침투성으로 되게 하는 섬유와 가도관 요소 같은 이차적으로 두꺼워진 세포들의 벽에 지배적으로 피착된다. 리그닌의 기계적 강성도는, 가도관 요소들이 조직 충돌 없이 증산으로부터 발생하는 음압을 견딜 수 있도록 이러한 조직들을 강화한다. 기계적 강도를 제공하는 것에 추가하여, 리그닌은 보호 기능을 갖는다. 예를 들어, 리그닌의 물리적 강인성과 화학적 내구성이 초식 동물의 의한 영양 공급을 중단하게 할 수 있다. 리그닌화는, 병원균의 침투를 차단하기 위한 물리적 장벽을 제공할 수 있는, 감염 또는 상처에 대한 빈번한 반응이다. 리그닌의 주요 빌딩 블록들은, 전형적으로 소량의 p-쿠마릴 알코올을 갖는, 히드록시신나밀 알코올(또는 모노리그놀) 코니페릴 알코올 및 시나필 알코올이다. 모노리그놀은, 일반적인 페닐프로파노이드 및 모노리그놀-특정 경로를 통해 Phe로부터 합성된다. Phe는 색소체의 시킵산 생체합성 경로로부터 유도된다. 리그닌 생체합성 경로의 특정 효소들, 즉, 시토크롬 P450 효소 신나메이트 4-히드록시라제(C4H), p-쿠마린산 3-히드록시라제(C3H), 및 페룰레이트 5-히드록시라제(F5H)는, 소포체의 시토크롬 측에서 활성화되는 것으로 여겨지는 멤브레인 단백질들이다. 비록 메타볼릭 채널링이 페닐알라닌 암모니아-리아제(PAL)와 C4H 간에 나타나 있지만, 다른 경로 효소들도 소포체에서 메타볼릭 복합체의 일부인지 여부는 미지 상태이다. 모노리그놀로부터 발생하는 유닛들은, 리그닌 중합체 내에 통합되는 경우, 과시아실(G), 시링길(S), 및 p-히드록시페닐(H) 유닛들이라 칭한다.

[0069] 리그닌은, 예를 들어, 식물 주맥, 식물 줄기 또는 식물 대에서 흔히 발견된다. 따라서, 본 발명에서 사용하기 위한 재료는, 식물 주맥 또는 식물 줄기 또는 식물 대 또는 이들의 혼합물 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함할 수 있고, 제거될 수 있다. 리그닌은, 예를 들어, 식물 주맥, 식물 줄기, 식물 대 등에서 발견될 수 있는 담배 식물의 관다발 내에 위치한다. 관다발은, 섬유성 야채 연결 조직에 의해 가깝게 함께 고정된 상대적으로 단단한 복수의 셀룰로오스 부채들로 구성되어 있다. 이러한 섬유성 관다발을 둘러싸는 것은 피층이고, 이는 줄기의 더욱 큰 부분 및 담배 잎의 라미나에 대한 특성과 특징에 더욱 가까운 부분을 구성하고 비교적으로 스폰지 같은 야채 조직 또는 커버링으로 형성되어 있다. 리그닌은 일반적으로 관다발 내에 위치한다. 관다발은 유관속 식물의 운반계의 일부이다. 운반 자체는, 물관부와 체관부인 두 가지 형태로 존재하는 관 조직에서 발생한다. 이러한 조직들 모두는 관다발 내에 존재하고, 여기에는 지지 및 보호 조직들이 부가적으로 포함될 것이다. 이러한 관 조직들 중에서, 리그닌은 물관부 내에서만 발견되고 있다.

[0070] 리그닌의 양은, 식물 주맥, 식물 줄기, 또는 식물 대 등 또는 이들 중 두 개 이상의 혼합물이나 조합에서 실질적으로 감소될 수 있다. 리그닌은, 식물 주맥, 식물 줄기, 또는 식물 대 등 또는 이들 중 두 개 이상의 혼합물이나 조합으로부터 실질적으로 제거될 수 있다. 적절하게, 관다발 또는 물관부 또는 이들의 조합은, 식물 주맥, 식물 줄기, 또는 식물 대 등 또는 이들 중 두 개 이상의 혼합물이나 조합에서 실질적으로 감소된다. 적절하게, 관다발 또는 물관부 또는 이들의 조합은, 식물 주맥, 식물 줄기, 또는 식물 대 등 또는 이들 중 두 개 이상의 혼합물이나 조합으로부터 실질적으로 제거된다. 적절하게, 리그닌화 후벽 조직은, 식물 주맥, 식물 줄기, 또는 식물 대 등 또는 이들 중 두 개 이상의 혼합물이나 조합으로부터 실질적으로 제거된다.

[0071] 리그닌이 식물의 다른 부분들로부터 또는 다른 식물 조직들로부터 쉽게 분리될 수 있으므로, 매트릭스-결합 NNK가 리그닌과 함께 위치지정된다는 것은 장점이다. 한 구현예에서, 리그닌의 양은 리그닌화 부분을 비리그닌화 조직으로부터 분리하여 감소된다. 예를 들어, 외피층은 리그닌을 함유하는 관다발로부터 쉽게 분리될 수 있고, 이에 따라 리그닌의 수준이 감소된 식물 재료를 얻을 수 있다. 감소된 수준의 리그닌을 함유하거나 리그닌을 실질적으로 함유하지 않는 식물 재료는, 본원에서 설명하는 바와 같이 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소된 담배 재료 또는 담배 제품의 제조에 사용될 수 있다. 선택적으로, 매트릭스-결합 NNK와 함께 공동 위치지정된 리그닌을 함유하는 분리된 식물 재료는 다른 공정들에서 폐기 또는 사용될 수 있다.

- [0072] 일 측면에서는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 재료 내의 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 매트릭스-결합 NNK의 양을 저감 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 이 방법에 따르면, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 제공한다. 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양이 감소된다. 리그닌은 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 이어서, 초기에 제공된 건조된 담배 식물이나 건조된 담배 식물 재료에 비해 또는 대조군에 비해, 리그닌의 양이 감소되고 매트릭스-결합 NNK의 양도 감소된 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 얻는다.
- [0073] 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 판다발 내에 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 판다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 주변 조직이 아니라 판다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 매트릭스-결합 NNK의 양은, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 판다발의 양을 감소시켜 감소되어 있다.
- [0074] 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 물관부 내에 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 주변 조직이 아니라 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 매트릭스-결합 NNK의 양은, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 물관부의 양을 감소시켜 감소되어 있다.
- [0075] 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 리그닌화 후벽 조직 내에 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은 리그닌화 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 완전하게 또는 부분적으로 제거될 리그닌은, 주맥의 외층 같은 주변 조직이 아니라 리그닌화 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 매트릭스-결합 NNK의 양은, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 리그닌화 후벽 조직의 양을 감소시켜 감소되어 있다.
- [0076] 다른 일 측면에서는, 건조 전에 담배 식물 또는 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양을 감소시키는 단계를 포함하는, 담배 식물 또는 담배 식물 재료의 건조 동안 매트릭스-결합 NNK의 형성을 저감, 감소, 방지, 또는 억제하는 방법을 제공하고 있다. 적어도 초기에, 담배 식물 또는 담배 식물 재료는 미건조 또는 실질적으로 미건조될 수 있다. 상기 방법은, 그렇지 않으면 후속하는 건조 공정 동안 발생할 NNK와 리그닌의 공동 위치지정을 저감, 감소, 방지, 또는 억제하는 데 사용될 수 있다. 본 측면에 따르면, 미건조된 담배 식물 또는 미건조된 담배 식물 재료 또는 실질적으로 미건조된 담배 식물 또는 실질적으로 미건조된 담배 식물 재료를 제공하고 있으며, 이러한 담배 식물 또는 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양이 건조 전에 또는 건조 동안 되어 있다. 리그닌은 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 리그닌은 판다발 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 판다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 주변 조직이 아니라 판다발 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 판다발은 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 리그닌은 물관부 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은 주변 조직이 아니라 물관부 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 물관부는 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 리그닌은 리그닌화 후벽 조직 내에 위치할 수 있다. 리그닌은 리그닌화 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 리그닌은, 주맥의 외층 같은 주변 조직이 아니라 리그닌화 후벽 조직 내에 배타적으로 위치할 수 있다. 따라서, 리그닌화 후벽 조직은 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 리그닌은 완전하게 제거되거나 부분적으로 제거될 수 있다. 당업계에 공지되어 있는 방법을 이용하여 담배 식물 또는 담배 식물 재료를 건조하는 단계를 거친 후에, 출발 물질에 비해서나 대조군이 얻을 수 있는 것에 비해 내부의 매트릭스-결합 NNK의 양과 리그닌의 양이 감소된 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 재료를 얻을 수 있다.
- [0077] 담배 식물 또는 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양은, 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법들을 이용하여 감소될 수 있다. 한 방법에서는, 줄기 묶음 등을 유체, 예를 들어, 물에 습윤 또는 침지되게 할 수 있고, 이는 피층을 부드럽게 하거나 팽화 또는 팽윤하게 하는 한편 리그닌을 미팽화 상태로 두게 한다. 피층은, 수동으로((예. 손으로) 제거되고 보유될 수 있고, 리그닌을 함유하는 판다발은 폐기되거나 다른 곳에서 사용될 수 있다. 이에 따라, 피층(예를 들어, 외피층)은, 리그닌화 조직으로부터 분리되고 보유될 수 있고, 미팽화된 리그닌화 조직이 폐기될 수 있다. 이어서, 피층은 추가 담배 가공을 위해 사용될 수 있다. 또한, 매트릭스-결합 NNK의 양이 검출 가능 수준 미만인 식물 피층(예를 들어, 식물 외피층) 또는 팽화된 식물 피층(예를 들어, 팽화된 식물 외피층)을 개시하고 있다. 이에 따라, 비리그닌화 식물 조직은, 리그닌화 조직과 비리그닌화 조직이 분리되도록 팽화될 수 있다. 적절하게, 비리그닌화 조직은 리그닌화 조직에 대하여 선택적으로 또는 우선적으로 팽화되어 있다.

- [0078] 추가 예로, 리그닌은 적절한 피층제거 기계류를 사용하여 분리될 수 있다. 피층제거기는, 나무껍질, 목재, 및 식물 대 등을 박리하기 위한 기계이다.
- [0079] 다른 방법에서는, 기계적 분리를 이용할 수 있다. 예를 들어, 줄기 묶음 등을 담근 후에 동결 건조가 뒤따를 수 있다. 다른 일례로, 줄기 묶음 등을 담근 후에 동결 건조, 분쇄, 및 사별이 뒤따를 수 있다. 적절하게는, 담배 재료가, 분쇄, 밀링 등을 위한 장비와 기술을 이용하여 분말 형태로 분쇄될 수 있다. 적절하게는, 담배 식물 재료는, 해머 밀(hammer mill), 커터 헤드(cutter head), 에어 컨트롤 밀(air control mill) 등과 같은 다양한 장비를 사용하여 분쇄 또는 밀링하는 동안에 비교적 건조한 형태로 있다.
- [0080] 식물 재료는, 당업계에 공지되어 있는 다양한 방법들을 이용하여 입자들 또는 미립자를 형성하도록 크기를 감소 되게 할 수 있다. 입자들 또는 미립자는, 리그닌의 수준이 감소되고 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소된 부분들을 얻도록 크기에 의해 분리될 수 있다. 적절한 한 방법에서, 식물 재료는, 처리될 식물 재료보다 단단한 하나 이상의 물체와의 충격 같은 충격에 의해 처리된다. 한 구현예에서는, 금속 볼 같은 금속과의 충격을 이용하고 있다. 충격은, 웨이킹 같은 다양한 방법들을 이용하여 전달될 수 있다. 예를 들어, 식물 재료는, 15분 동안 300rpm의 웨이킹으로 스틸 볼(2개의 스틸 볼, 직경 2cm)에 의한 충격을 받을 수 있다. 입자들 또는 미립자는, 사별 셰이커를 사용하여 서로 다른 크기(들)의 부분들로 크기에 의해 분리될 수 있다. 적절하게, 평균 입자는 약 0.5mm보다 크고, 약 0.85mm보다 크고, 또는 약 1mm보다 크다. 이러한 크기의 부분들은 감소된 수준의 리그닌 및 감소된 수준의 매트릭스-결합 NNK를 가질 수 있다.
- [0081] 식물 재료는, 그 식물 재료의 습윤 함량이 약 15 중량% 미만 내지 약 5 중량% 미만인 경우 분쇄 또는 밀링될 수 있다. 담배 재료는 미세하게 분쇄될 수 있다. 미세 분쇄 담배 재료는 통상적으로 약 30 내지 600 μ m의 입자 크기를 갖는다.
- [0082] 한 구현예에서, 상기 방법은, 예를 들어 유체와의 접촉(예. 물 담금에 의함)에 의한 팽화, 이어서 동결 건조를 포함하고, 이에 따라 식물 재료가 팽화하며, 이는 리그닌을 함유하지 않거나 단지 낮은 수준의 리그닌을 함유한다. 리그닌화 식물 재료는, 팽화된 식물 조직보다 높은 밀도, 높은 물리적 강도, 및 작은 입자 크기를 보유하며, 이에 따라 크기에 의한 분리를 허용한다. 다른 한 구현예에서, 상기 방법은, 팽화, 이어서, 동결 건조, 이어서 분쇄(예를 들어, 전술한 바와 같이 충격에 의함), 이어서 결과물 부분들의 분급(예를 들어, 크기에 의한 분급), 및 리그닌의 수준이 감소되고 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소된 입자들의 선택을 포함하고 있다. 사별은 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 또 다른 한 구현예에서, 상기 방법은, 팽화, 이어서 분쇄 또는 파쇄 또는 이들의 조합(예를 들어, 전술한 바와 같이 충격에 의함), 이어서 형성되는 입자들의 (예를 들어, 사별을 이용하거나 밀도 및/또는 기계적 강도에 기초하는) 크기에 의한 선별, 및 리그닌의 수준이 감소되고 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소된 입자들의 선택을 포함하고 있다. 서로 다른 크기의 부분들은, 또한, 이들의 유리된-NNK 함량 또는 이들의 NNN 함량 또는 이들의 니코틴 함량 또는 이들 중 두 개 이상의 조합에 있어서 상이할 수 있다.
- [0083] 리그닌의 완전한 또는 부분적인 제거에 이어서, 식물 재료는, 선택적으로, 담배 제품에서 사용되도록 추가 가공될 수 있다. 한 예로서, 이 재료는 수용성 슬러리로 형성될 수 있다. 형성되는 슬러리는, 내부에 분산되어 있는 콜로이드 피층 입자들의 상당 부분을 함유할 수 있다. 담배 피층을 수용성 슬러리로 변환하는 것은, 볼 밀 또는 콜로이드 밀 같은 적절한 유형의 밀을 이용하여 달성될 수 있다. 피층과 수용성 슬러리의 추가 가공이 여기에 설명되어 있다.
- [0084] 소정의 구현예들에서, 본원에서 설명하는 방법들에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는 식물 재료는, 관다발을 둘러싸는 조직, 또는 물관부를 둘러싸는 조직 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있으며, 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합은 실질적으로 없다. 소정의 구현예들에서, 식물 재료는, 관다발 또는 물관부를 둘러싸는 조직, 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있고, 실질적으로 관다발이 없으며, 또는 물관부가 없고, 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들 중 두 개 이상의 조합이 없다. 소정의 구현예들에서, 식물 재료는, 관다발 또는 물관부를 둘러싸는 조직, 또는, 리그닌화 후벽 조직, 또는 이들 중 두 개 이상의 조합을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있고, 관다발이 없거나, 또는 물관부가 없거나, 또는 리그닌화 후벽 조직 이 없거나 또는 이들 중 두 개 이상의 조합이 없다. 소정의 구현예들에서, 식물 재료는, 담배 외피층을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있다. 소정의 구현예들에서, 식물 재료는 식물 주맥의 외층들을 포함하고 있거나, 그것으로 이루어져

있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있다.

- [0085] 본원에서 설명하는 방법들은, 유리된 NNK의 수준 또는 매트릭스-결합 NNK의 수준 또는 이들의 조합을 측정하고 선택적으로 이들 수준을 비교하는 하나 이상의 추가 단계를 포함할 수 있다. 유리된 NNK와 매트릭스-결합 NNK를 측정하는 방법들을 본원에서 설명한다. 한 구현예에서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양은, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료에서 결정되고 있다. 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료 내의 리그닌의 양을 감소시킨 후, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 다시 측정할 수 있다. 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을 초기 출발 물질과 비교하여 매트릭스-결합 NNK의 수준이 감소되었는지 여부를 확인할 수 있다. 이 단계에서, 이전에 측정된 적어도 매트릭스-결합 NNK의 수준을, 리그닌의 양의 감소 이후에 측정되는 NNK의 수준과 비교할 수 있다. 초기에 제공된 담배 재료 대비 리그닌의 양의 감소에 따라 얻어지는 담배 식물의 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는, 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되었음을 나타낸다.
- [0086] 본원에서 설명하는 방법들은, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 수준들을 측정하고, 선택적으로, 그 수준들을 비교하는 하나 이상의 추가 단계를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양이, 미건조 담배 식물 또는 미건조 담배 식물 재료에서 측정되어 있다. 선택적으로, 미건조 담배 식물 또는 미건조 담배 식물 재료의 리그닌의 양을 감소시킨 후 건조 전에, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합의 양을 다시 측정할 수 있다. 상기 방법은 하나 이상의 비교 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은, 전술한 바와 같이, 적어도 초기에 측정된 매트릭스-결합 NNK의 수준을 이후에 측정된 NNK의 수준과 비교하는 추가 단계를 포함할 수 있고, 초기에 제공되는 담배 재료에 대비하여 담배 물질의 매트릭스-결합 NNK의 양의 감소는, 담배 재료의 매트릭스-결합 NNK의 양이 감소되어 있을 나타낸다.
- [0087] 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합은, 상기 방법의 시작 및/또는 상기 방법의 종료시 및/또는 상기 방법 동안 측정될 수 있다. 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합은, 간헐적으로 또는 간격을 두고서 측정될 수 있다. 간격은 고정된 간격 또는 랜덤한 간격일 수 있다. 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합은, 유리된 NNK 또는 매트릭스-결합 NNK 또는 이들의 조합이 원하는 양, 농도, 또는 범위 내에서 존재함을 확인하도록 상기 방법의 종료시 측정될 수 있다.
- [0088] 리그닌은 리그닌에 공유 결합 또는 비공유 결합될 수 있다. NNK에 공유 결합 또는 비공유 결합된 리그닌을 포함하는 복합체가 설명되어 있다. 복합체를 포함하는 식물 세포, 식물 조직 또는 식물 또는 식물 재료도 또한 개시되어 있다. 내부에 있는 복합체의 양을 감소시키는 단계를 포함하고 있는, 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료의 매트릭스-결합 NNK의 양을 감소시키는 방법도 설명되어 있다.
- [0089] 추가 측면에서는, 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군 식물 조직에 비해 감소된 수준의 리그닌을 함유하는 건조된 식물 조직을 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 약 3500ng/g 이하이다. 매트릭스-결합 NNK의 양은 약 3000ng/g 이하, 약 2500ng/g 이하, 약 2000ng/g 이하, 약 2000ng/g 이하, 약 1500ng/g 이하, 약 1000ng/g 이하, 또는 약 500ng/g 이하일 수 있다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 평균 입자 크기는 약 0.5mm 초과, 약 0.85mm 초과, 또는 약 1mm 초과일 수 있다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 유리된 NNK의 양은, 약 330ng/g 이하, 약 300ng/g 이하, 약 250ng/g 이하, 약 200ng/g 이하, 약 150ng/g 이하, 약 100ng/g 이하, 또는 약 50ng/g 이하일 수 있다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 NNN의 양은, 약 1700ng/g 이하, 약 1500ng/g 이하, 약 1300ng/g 이하, 약 1100ng/g 이하, 약 1000ng/g 이하, 또는 약 500ng/g 이하일 수 있다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 니코틴의 양은, 약 2600 μ g 이하, 약 2300 μ g 이하, 또는 약 2100 μ g 이하일 수 있다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6.5% 이하, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6%, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 5%, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 4%, 또는 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 3%일 수 있다.
- [0090] 한 구현예에서는, 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군 식물 조직에 비해 감소된 수준의 리그닌을 함유하고 있는 식물 조직을 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 약 3500ng/g 이하이고, 평균 입자 크기는 약 0.5mm 이상이다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 300ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1700ng/g 이하이다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6.4% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2600 μ g 이하이다.
- [0091] 다른 한 구현예에서는, 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군 식물 조직에 비해 감소된 수준의 리그닌을 함

유하고 있는 건조된 식물 조직을 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 1900ng/g 이하이고, 평균 입자 크기는 약 0.85mm와 약 1mm 사이이다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 250ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1270ng/g 이하이다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 4.4% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2300 μ g 이하이다.

[0092] 또 다른 한 구현예에서는, 리그닌의 양이 감소되어 있지 않은 대조군 식물 조직에 비해 감소된 수준의 리그닌을 함유하고 있는 건조된 식물 조직을 제공하고 있으며, 매트릭스-결합 NNK의 양은 약 1600ng/g 이하이고, 평균 입자 크기는 약 1mm 초과이다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 200ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1100ng/g 이하이다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 3% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2100 μ g 이하이다.

[0093] 본원에서 설명하는 방법(들)의 시작시 사용되는 담배 식물 또는 담배 식물 재료는, 미건조 담배 식물 또는 미건조 담배 식물 재료 또는 건조된 담배 식물 또는 건조된 담배 식물 재료를 포함하고 있거나 그것으로 이루어져 있거나, 또는 본질적으로 그것으로 이루어져 있을 수 있다. 담배 잎, 특히 녹색 담배잎을 건조하는 공정은 공기-건조(air-curing), 화건(fire-curing), 열건(flue-curing) 및 양건(sun-curing)을 비제한적으로 포함하는 본 기술분야에 공지된 기술이다. 녹색 담배잎을 건조하는 공정은 수확된 담배의 종류에 의존한다. 예를 들어, 버지니아 플루(Virginia flue)(brigt) 담배는 일반적으로 열건하며, 버얼리(Burley) 및 특정 어두운 색깔의 종은 보통 공기-건조하고, 그리고 파이프 담배, 씹는 담배, 및 코담배는 보통 화건한다. 임의의 종류의 담배로부터 담배 재료가 사용될 수 있지만, 소정의 종류의 담배가 바람직하다. 특히 바람직한 담배 재료는 황색종, 터키종, 버얼리종, 버지니아종, 매릴랜드종, 오리엔트종, 또는 그들의 2개 이상의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 담배 재료의 형상은 일반적으로 한정되지 않는다. 그 형상은 균질화 담배(homogenized tobacco) 재료의 형태일 수 있다. 담배 균질물(Tobacco homogenate) - 예를 들면 한정되지 않지만 건조 담배 균질물 -이 당 기술분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 담배 재료로부터 준비될 수도 있고, 예를 들면, 담배는 잘린 형태, 분쇄된 형태, 알갱이로 된 형태, 미립자 형태, 또는 분말 형태일 수도 있다. 소정의 구현예들에서, 리그닌을 분리하는데 사용될 수 있는 특정 기계적 분리 방법은 분쇄 및/또는 사별 단계를 필요로 할 수 있기 때문에, 분쇄 또는 분말 형태인 담배 재료로 시작하지 않는 것이 바람직하다.

[0094] 상기 담배 재료는 이들에만 한정되는 것은 아니지만, 다음과 같은 구성 성분뿐만 아니라 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는 첨가제를 포함하고 있을 수 있다: 향미제, 유기 및 무기 충전제 (예를 들면, 곡류, 가공 곡물, 빵튀기, 말토덱스트린, 텍스트로스, 탄산 칼슘, 인산 칼슘, 옥수수 전분, 락토오스, 만니톨, 자일리톨, 소르비톨, 미분 셀룰로오스, 기타 등등), 결합제 (예를 들면, 포비돈, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨 및 기타 변형된 셀룰로오스형 결합제, 알긴산 나트륨, 크산탄 검, 전분계 결합제, 아라비아 검, 레시틴 기타 등등), 착색제 (예를 들면, 카라멜 색소 및 이산화 티탄 기타 등등을 포함한 염료 및 안료), 습윤제 (예를 들면, 글리세린, 프로필렌 글리콜 기타 등등), 구강 관리 첨가제, 보존제 (예를 들면, 소르빈산 칼륨 기타 등등), 시럽 (예를 들면, 꿀, 고 과당 옥수수 시럽, 및 향미제로서 사용된 것 등), 및 봉해 보조제 (예를 들면, 미세결정 셀룰로오스, 크로스 카르멜로스 나트륨, 크로스포비돈, 전분 글리콜산 나트륨, 예비젤라틴화 옥수수 전분 기타 등등). 이러한 첨가제는 당해 기술분야의 숙련자에게 공지되어 있으며, 기술 분야에 공지된 양과 형태로 존재할 수도 있다.

[0095] 상기 담배는 재구성 담배로 형성될 수 있다. 한 구현예에서, 본원에 개시된 방법들은 상기 담배 재료는 재구성 담배, 예컨대 재구성 담배 (잎) 시트의 제조에 사용될 수 있다. 이 시트는 재활용 담배 미분, 담배 줄기 및 모든 담배 가공 단계에서 수집되는 크기가 일반적으로 30 메쉬 미만인 담배 입자로 구성되는, "등급 담배"로 만들 수 있는 종이 같은 재료이다. 상기 재구성 담배는 담배 부산물 내의 가용성 화학물질을 추출하고, 추출로부터 남은 담배 섬유를 종이로 가공하고 나서, 농축 형태의 상기 추출된 물질을 상기 종이 상에 다시 적용하여 제조될 수 있다. 재구성 담배는 일반적으로 다양한 방식으로 형성될 수도 있다. 예를 들어, 한 구현예에서, 밴드 주조를 이용해서 재구성 담배를 형성할 수 있다. 밴드 주조는 전형적으로 미세하게 분할된 담배 부속물 슬러리와 스틸 밴드 상에 코팅된 후 건조되는 결합제를 사용한다. 건조 후, 시트는 천연 담배 스트립과 배합되거나 파쇄되고 및 필러 충전제 같은 것을 포함한, 다양한 담배 제품에 사용된다. 재구성 담배 생산 공정들의 일부 예는 US 3,353,541, US 3,420,241, US 3,386,449, US 3,760,815 및 4,674,519에 설명되어 있다. 재구성 담배는 제지 공정에 의해 형성될 수도 있다. 이 공정에 따라 재구성 담배를 형성하기 위한 공정들의 예는 US 3,428,053, US 3,415,253, US 3,561,451, US 3,467,109, US 3,483,874, US 3,860,012, US 3,847,164, US 4,182,349, US 5,715,844, US 5,724,998; 및 US 5,765,570에 설명되어 있다. 예를 들면, 제지 기술을 이용하여 재구성 담배를 형성하는 것은 담배를 물과 혼합하는 단계, 그로부터 가용성 성분을 추출하는 단계, 상기 가용성 성분을 농축시키는 단계, 상기 담배를 정제시키는 단계, 웹을 형성하는 단계, 상기 농축된 가용성 성분을 재적용하는 단계,

건조시키는 단계, 및 타작하는 단계를 포함할 수 있다. 다양한 성분-예컨대 향미제 또는 색상 처리제-이 웹에 적용될 수 있다.

[0096] 본원에 기재된 방법에 의해 수득되었거나 수득가능한 담배는 담배 시트-예컨대 재구성 담배 시트로 형성될 수도 있다. 본 구현예에 따르면, 상기 방법은 (a) 본원에 기재된 방법에 따른 담배 재료-예컨대 담배 균질물-를 수득하는 단계; (b) 담배 균질물 슬러리를 제조하는 단계; (c) 담배 균질물 슬러리를 주조하는 단계; 및 (d) 담배 균질물 슬러리를 건조하여 재구성 담배 시트를 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 구현예에 따르면, 상기 방법은 (a) 본원에 기재된 방법에 따른 담배 재료-예컨대 담배 균질물-를 수득하고 담배 슬러리를 제조하는 단계; (b) 담배 균질물 슬러리를 주조하는 단계; 및 (c) 담배 균질물 슬러리를 건조하여 담배 시트를 형성하는 단계를 포함할 수도 있다.

[0097] 상기 담배 균질물 슬러리를 주조하는 단계는 당 기술분야에 공지되어 있는 주조 또는 제지 공정 중 하나를 이용하여 수행될 수도 있다. 예로서, 주조 공정은 US 5,724,998 및 US 5,584,306에 기재되어 있고; 제지 공정은 US 4,341,228; US 5,584,306 및 US 6,216,706에 기재되어 있다. 주조 공정은 통상적으로 슬러리를 연속 스테인레스 스틸 벨트 상에 주조하는 단계, 상기 주조된 슬러리를 건조시켜서 재구성 담배 시트를 형성하는 단계, 및 상기 시트를 제거하는 단계를 포함하고 있다. 제지 공정은 일반적으로 원하는 시트를 형성하기 위해 헤드 박스로부터의 와이어 스크린 상에 수성 슬러리를 주조하는 단계를 포함하고 있다. 상기 수성 슬러리는 가용성 부분과 섬유상 부분으로 분리될 수도 있다. 물이 상기 섬유상 부분으로부터 배출되고, 그렇게 형성되는 시트가 연속적으로 처리되고, 건조된다.

[0098] 담배 슬러리는 하나 이상의 결합제 - 예를 들면 검(gum) 및 펙틴(pectin) -를 더 포함할 수도 있다. 상술한 바와 같이, 재생 담배 시트(reconstituted tobacco sheet)를 준비하는 데에 사용되는 담배 슬러리는, 이들에만 한정되지는 않지만, 하나 이상의 다음과 같은 구성 성분, 즉 목재 셀룰로오스 섬유, 에어로졸 형성제, 당분, 및 향미제 및 결합제 뿐만 아니라 이들의 조합을 포함하는, 공용 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상술한 첨가제 목록은 당 기술분야에 숙련자에게 공지되어 있고, 당 기술분야에 공지된 양 및 형태로 이들 수용성 슬러리 내에 존재할 수 있다.

[0099] 본원에서 설명되는 재생 담배 시트는, 준비되면, 쥘렌 및 다른 담배 제품에 적절한 담배 충전제(tobacco filler)를 생성하도록 전체 잎 담배와 유사한 방식으로 절단될 수도 있다. 본원에서 설명되는 재생 담배 시트는 한 측면 상에 약 50 내지 100mm 사이로, 기계식 핑거에 의해 천연 담배 박층 스트립과 유사한 크기의 조각으로 또한 부서지거나 벗겨질 수 있거나 다이아몬드 형상의 조각으로 절단될 수도 있다. 본원에서 설명되는 재생 담배 시트 조각은 황색종 담배, 버얼리종 담배, 매릴랜드종 담배, 오리엔트종 담배, 레어 담배(rare tobacco), 특수 담배(specialty tobacco), 팽화 담배(expanded tobacco) 등과 같은 다른 담배와 또한 배합될 수도 있다. 특정 쥘렌 브랜드의 제조에서 사용되는 담배 배합물 내의 각 종류의 담배의 정확한 양은 브랜드마다 다르다. 예를 들면, Tobacco Encyclopaedia, Voges (Ed.) p. 44-45 (1984), Browne, The Design of Cigarettes, 3rd Ed., p.43 (1990) 및 Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (Eds.) p. 346 (1999)을 참조한다. 그런 다음, 전체 배합물이 각조(cut filler)로 잘릴 수 있거나 담배 제품에 포함될 수 있다.

[0100] 추가 측면에 따르면, 담배 배합물을 형성하도록 적어도 두 개의 서로 다른 유형의 담배가 배합되는 담배 배합 방법을 제공하고 있다. 다양한 담배 배합물들은, 서로 다른 담배 유형들을 배합하기 위한 서로 다른 레시피를 갖는다. 담배 유형들은, 예를 들어, 버얼리종 담배, 열 건조형 담배, 오리엔탈형 담배, 브라이트형 담배, 및 재구성 담배일 수 있다. 버얼리종 담배, 화력 건조형 담배, 및 오리엔탈형 담배는 특정 유형의 담배인 한편, 브라이트형 담배는 열 건조형 담배와 오리엔탈형 담배의 예비-배합물 (pre-blend)이다. 이 방법에 따르면, 제1(유형의) 건조된 담배 식물 재료를 제공하고 있으며, 이의 리그닌의 양이 감소되어 있다. 본원에서 설명하는 방법들 중 임의의 방법은 리그닌의 양을 감소하는데 이용될 수 있다. 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정할 수 있고, 초기에 제공된 제1 건조된 담배 식물 재료에 비해 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량이 감소된 건조된 담배 식물 재료를 추가 사용을 위해 선택할 수 있다. 다음으로, 제1 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK보다 많은 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 갖는 제2 건조된 담배 식물 재료가 제공되어 있다. 일부 구현예들에서, 이러한 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량은 미리 공지되어 있을 수 있어서, 이러한 값들에 대한 측정이 필요하지 않다. 다른 구현예들에서는, 이러한 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량이 공지되어 있지 않을 수 있어서, 측정이 필요할 것이다. 따라서, 제2 건조된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정하는 것은, 이 방법에서 선택적인 단계이다. 이러한 단계들로부터 얻어지는 제1 및 제2 건조된 담배 식물 재료들은, 당업계에 공지되어 있는 공정들을 이용하여 함께 배합될 수 있다. 선택적으로, 최종 배합된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량을 측정할

수 있다. 이 방법에 따르면, 최종 배합된 담배 식물 재료의 총 및/또는 매트릭스-결합 NNK 함량이 제2 건조된 담배 식물 재료보다 적은 배합된 담배 식물 재료를 얻을 수 있다. 유리한 점은, 이 방법을 이용하여 담배 재료의 배합물의 전체 NNK 함량이 감소된 담배 재료의 배합물을 제공할 수 있다는 점이다. 본질적으로, 내부 리그닌의 양이 감소된 담배 재료는, 배합된 담배 재료의 전체 NNK 함량을 희석하거나 감소시키는 데 사용되고 있다.

[0101] 본원에서의 개시에 따라 수득되었거나 수득가능한 담배 재료는 담배 각초 및 상기 각초의 담배 로드로 형성된 흡연 물품에서 또한 사용될 수 있다. 통상적으로, 흡연 물품용 각초 담배 제품은 타작 공정(threshing process) 동안에 잎의 줄기 부분으로부터 분리되는 담배 잎의 박층 부분으로 대부분 형성된다. 박층이 제거되고 분리된 후에 남아 있는 대부분의 줄기 부분은 사용되지 않는다. 상용적으로 사용될 수 있는 담배 재료의 양을 증가시키기 위해서, 일부 담배 줄기가 박층과 함께 각초에 다시 첨가될 수 있다. 각초에서 사용하기 위한 담배 줄기의 맛 및 연소 특징을 개선하기 위해서, 줄기에는 종종 본원에서 설명되는 공정들을 포함할 수 있는 하나 이상의 처리 공정이 먼저 실시된다. 말기(rolling) 단계가 본 발명의 방법이 실시되어 있는 담배 줄기에 대해 수행될 수 있다. 줄기는 원하는 두께 - 예를 들면 약 0.6mm 내지 0.8mm의 평균 두께 -로 말아진다. 차후의 처리 및 보관 단계들 동안에, 줄기는 약 0.8mm 내지 약 1.0mm의 최종 두께로 팽화될 수 있다. 말기 후, 줄기는 건조되고, 그들이 절단되어 담배 각초에 첨가되는 담배 제조 공장으로 이송된다. 일부의 경우에서, 말기 단계는 대안적으로 각초에 대한 온라인 생산 공정의 일부로서 포함될 수도 있다. 통상적으로, 담배 줄기의 수분 함량은 줄기의 구조에 대한 손상을 방지하기 위해서 말기 전에 약 28% 내지 약 34% 오븐 볼러타일(oven volatile)이다. 필요한 경우, 담배 줄기는 수분 함량을 이러한 수준으로 증가시키기 위해서 말기 전에 컨디셔닝될 수 있다. 담배 줄기를 컨디셔닝하기 위한 공지된 공정은 줄기를 물, 증기 또는 물과 증기의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함하고 있다. 말기 단계가 온라인에 포함되고 건조된 줄기가 사용되는 방법에서, 컨디셔닝 단계는 통상적으로 더 오래 걸릴 것이고 줄기를 말기 전에 다수의 시간 동안 물 속에 담그는 침지 단계를 필요로 할 수도 있다. 담배 줄기 하나의 단계의 말기 공정을 사용하여 말아서 줄기의 두께를 원하는 평균 두께로 감소시킬 수 있다. 말기 후, 줄기는 약 0.1mm와 0.2mm 사이의 절단 폭으로 절단될 수 있다. 그런 다음, 절단되고 말아진 줄기가 공지된 줄기 팽화 기술을 사용하여 선택적으로 팽화되고, 그 다음에 건조된다. 줄기가 미리 말아지고 건조된 경우, 통상적으로 담배 줄기의 수분 함량을 약 28%와 34% 오븐 볼러타일(oven volatile) 사이로 다시 증가시키기 위해서 절단 전에 줄기를 컨디셔닝할 필요가 있을 것이다. 이는 담배 줄기의 유연성(pliability)을 증가시켜서 절단 동안에 줄기의 손상 또는 파손을 제한한다. 마지막으로, 절단되고 말아진 줄기가 담배 절단 박층 및 추가 담배 재료들과 조합되어 적어도 5중량%의 절단되고 말아진 담배 줄기를 갖는 각초를 형성한다.

[0102] 따라서, 추가 측면에서, 담배 각초로서 사용하기 위한 담배 제조 방법이 제공되어 있다: (a) 본 발명에 개시된 방법(들)을 수행하는 단계; 및 (b) 담배 각초로서 사용되도록 담배 재료를 말기 및 절단하는 단계. 또한 담배 각초에 사용하기 위해 담배 재료-예컨대 담배 줄기-를 처리하는 방법이 기재되어 있는데, 상기 방법은 다음 단계를 포함하고 있다: (a) 본 발명에 개시된 방법을 수행하는 단계; 및 (b) 담배 재료 말기 단계; (c) 말아진 담배 재료의 절단 단계; 및 (d) 선택적으로 상기 절단된 말아진 줄기의 건조 단계. 상기 말아진 담배 줄기(rolled tobacco stem)는 담배 박층과 결합되어서 상기 단계들이 결합된 담배 줄기와 박층 상에서 수행될 수 있다. 상기 절단 단계는 상기 말아진 줄기를 약 0.3mm와 1.3mm 사이의 절단 폭으로 절단하는 것을 포함할 수 있다. 상기 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다: 담배 잎에서 줄기를 제거하는 단계; 상기 줄기를 약 15mm 내지 80mm의 평균 길이로 절단하는 단계; 및 상기 줄기를 0.1mm와 0.5mm 사이의 두께로 마는 단계. 말아진 담배 줄기를 포함하는 각초를 생산하는 방법 또한 제공되어 있는데, 상기 방법은 본원에 기재된 방법을 이용하여 담배 줄기를 처리하는 단계; 및 상기 처리된 줄기를 담배 박층, 팽화된 담배 또는 재구성 담배 중의 적어도 한 종류와 배합시켜서 각초를 생산하는 단계를 포함하고 있다.

[0103] 본원에 기재된 방법에 의해 수득되었거나 수득가능한 담배 각초는 0.8mm 및 1.1mm 사이, 바람직하게는 약 0.9mm의 평균 절단 폭과 약 0.2mm의 평균 두께를 갖는 담배 박층을 적어도 60중량%, 바람직하게는 적어도 80중량% 포함할 수 있다. 담배 각초는 약 0.8mm 및 1.1mm 사이, 더욱 바람직하게는 약 0.9mm의 평균 절단 폭과 약 0.2mm의 평균 두께를 갖는 담배 박층을 최대 95중량% 포함할 수 있다. 따라서 각초 내의 담배 박층의 입자들은 담배 줄기의 입자들과 비슷한 크기를 갖는다. 이와 같이, 담배 줄기는 높은 함유율에서조차도, 시각적으로 담배 박층과 구별되지 않는다. 또한, 담배 줄기와 박층의 배합물은 유리하게도 줄기를 중대하게 설정하지 않고 효과적으로 운반되고 처리될 수 있다. 적절하게는, 절단된 말려진 담배 줄기의 절단 평균 폭은 각초 내의 담배 박판의 평균 두께의 약 0.1mm 이내, 더욱 적합하게는 약 0.05mm 이내이다. 각초는 다양한 흡연 물품으로 통합될 수도 있다. 예를 들면, 각초는 필터 쉘런, 가는 엽쉘런 또는 엽쉘런 같은 가연성 흡연 물품의 담배 로드(rod)에 이용될 수도 있다. 대안적으로, 각초는 중류 기반 흡연 물품의 담배 에어로졸 발생 기재, 또는 전기 가열식 흡연 시스템을 제공하는 데 사용될 수도 있다. 대안적으로, 각초는 예를 들어, 파이프에 사용하기 위해, 말아피는 제품(roll-

your-own product), 또는 느슨한 담배(loose tobacco) 제품으로서 사용될 수도 있다.

- [0104] 상기 담배 재료는 다양한 소비 제품-예컨대 담배 제품-에 통합될 수도 있다. 또한 이러한 담배 제품을 제조하기 위한 방법이 포괄되어 있다. 담배 제품은 제한 없이 흡연 물품 또는 흡연성 물품 및 불연성 담배 제품, 가열식 제품, 및 에어로졸 발생 제품을 포함한 무연 담배 제품을 포함하고 있다. 흡연 물품 또는 흡연성 물품의 비제한적인 예로는 쉘, 가는 엽쉘, 엽쉘 및 파이프 담배를 포함하고 있다. 무연 담배 제품의 비제한적인 예로는 씹는 담배, 코담배(snuff) 및 에어로졸 발생 제품에 사용하기 위한 기재를 포함하고 있다. 무연 담배 제품은, 건조 입자, 세질, 과립, 분말, 또는 슬러리를 포함한 임의의 형태, 또는 박편, 필름, 탭, 폼(foam), 또는 구슬(bead) 같은 임의의 형태로 된 다른 성분들에 피착되거나, 혼합되거나, 둘러싸인 담배를 포함할 수도 있다. 무연 담배 제품의 액체 내용물은 장치에 함유되거나 구슬 같은 형태에 동봉되어서 수용성 래퍼와의 상호 작용을 배제시킨다. 상기 래퍼는 파우치 형상이어서 담배 내장형 조성을 부분적으로 또는 완전히 둘러싸거나, 또는 접착제로서 작용해서 복수의 탭, 구슬, 또는 담배 플레이크를 함께 고정할 수도 있다. 래퍼를 구성하기 위한 예시적인 재료는 HPMC, CMC, 펙틴, 알긴산염, 폴루란, 및 기타 상업적으로 이용가능한, 식용 필름 형성 고분자를 포함하는 필름 조성을 포함하고 있다. 다른 포장 재료는 젤라틴, HPMC, 전분/카라기난, 또는 기타 상업적으로 입수 가능한 물질로부터 생산된 예비 형성된 캡슐을 포함할 수도 있다. 이러한 포장 재료는 성분으로서 담배를 포함할 수도 있다. 구두로 봉괴할 수 없는 래퍼는 식물 또는 부식포 식물로 구성된 것이거나, 코팅 또는 미-코팅 종이로 구성된 것이거나, 또는 천공되었거나 그렇지 않으면 다공성 플라스틱 필름으로 구성된 것일 수도 있다. 래퍼는 향미제 또는 착색제를 포함할 수도 있다. 무연 제품은 소형 포장재가 수직 형태/충진/밀봉 포장 기계로 형성될 수 있는, 블리스터 포장 같은 방법을 포함하여, 상업 포장 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 함께 조립될 수 있다.
- [0105] 이들 흡연가능한 물품 및 무연 물품 그리고 이들의 에어로졸 내의 매트릭스-결합 NNK의 양은 대조군 담배 식물 재료로부터 유도된 소비 제품과 비교할 때 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100% - 예컨대 약 200% 또는 300% - 낮을 수도 있다. 유리된 NNK의 양은 실질적으로 불변일 수 있다.
- [0106] 이러한 흡연가능 물품, 무연 제품, 및 에어로졸 등의 매트릭스-결합 NNK의 양은, 약 3500ng/g 이하, 또는 약 3000ng/g 이하, 또는 약 2500ng/g 이하, 또는 약 2000ng/g 이하, 또는 약 1500ng/g 이하, 또는 약 1000ng/g 이하, 또는 약 500ng/g 이하일 수 있다.
- [0107] 이러한 흡연가능 물품과 무연 제품 등의 유리된 NNK의 양은, 약 330ng/g 이하, 약 300ng/g 이하, 약 250ng/g 이하, 약 200ng/g 이하, 약 150ng/g 이하, 약 100ng/g 이하, 또는 약 50ng/g 이하일 수 있다.
- [0108] 이러한 흡연가능 물품, 무연 제품, 에어로졸 등의 NNN의 양은, 약 1700ng/g 이하, 약 1500ng/g 이하, 약 1300ng/g 이하, 약 1100ng/g 이하, 약 1000ng/g 이하, 또는 약 500ng/g 이하일 수 있다.
- [0109] 이러한 흡연가능 제품, 무연 제품 등의 니코틴의 양은, 약 2600 μ g 이하, 약 2300 μ g 이하, 약 2100 μ g 이하, 약 2000 μ g 이하, 약 1900 μ g 이하, 또는 약 1800 μ g 이하일 수 있다.
- [0110] 이러한 흡연가능 물품, 무연 제품 등의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6.5% 이하, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6%, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 5%, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 4%, 또는 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 3%일 수 있다.
- [0111] 한 구현예에서, 이러한 흡연가능 물품, 무연 제품 등의 매트릭스-결합 NNK의 양은, 약 3500ng/g 이하이고, 유리된 NNK의 양은 약 300ng/g 이하이고, NNN의 양은 약 1700ng/g 이하이고, 리그닌의 양은 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6.4% 이하이고, 니코틴의 양은 약 2600 μ g 이하이다.
- [0112] 한 구현예에서, 흡연가능 제품, 무연 제품 등은, 약 3500ng/g 이하의 매트릭스-결합 NNK를 포함하고 있다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 300ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1700ng/g 이하이다. 적절하게, 리그닌의 양은 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 6.4% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2600 μ g 이하이다. 적절하게, 평균 입자 크기는 약 0.5mm 이상이다.
- [0113] 다른 한 구현예에서, 흡연가능 물품, 무연 제품 등은 약 1900ng/g 이하의 매트릭스-결합 NNK를 포함하고 있다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 250ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1270ng/g 이하이다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 4.4% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2300 μ g 이하이다. 적절하게, 평균 입자 크기는 약 0.85mm와 약 1mm 사이이다.

- [0114] 또 다른 구현예에서, 흡연가능 물질, 무연 제품 등은, 약 1600ng/g 이하의 매트릭스-결합 NNK를 포함하고 있다. 적절하게, 유리된 NNK의 양은 약 200ng/g 이하이다. 적절하게, NNN의 양은 약 1100ng/g 이하이다. 적절하게, 이러한 건조된 식물 조직의 리그닌의 양은, 건조된 식물 조직의 총 건식 중량 함량의 약 3% 이하이다. 적절하게, 니코틴의 양은 약 2100 μ g 이하이다. 적절하게, 평균 입자는 약 1mm 초과이다.
- [0115] 상기 담배 재료는 담배 식물로부터 유도될 수 있는데, 니코티아나(Nicotiana) 속 식물, *N. rustica* 및 *N. tabacum*을 포함한, 다양한 니코티아나 종을 포함하고 있다. 상기 담배 재료는 일반적으로 플루(flue) 또는 브라이트(bright) 품종, 버얼리 품종(Burley varieties), 다크 품종 및 오리엔탈/터키 품종이라고 공지된, 니코티아나 종의 품종들로부터 유도될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 담배 재료는 버얼리, 버지니아, 배기-건조, 공기-건조, 화력-건조, 오리엔탈, 또는 다크 담배 식물로부터 유도된다. 일부 구현예에서, 담배 재료는 예를 들어 이하의 품종 중 하나 이상으로부터 유도된다: *N. tabacum* AA 37-1, *N. tabacum* B 13P, *N. tabacum* Xanthi (Mitchell-Mor), *N. tabacum* KT D#3 Hybrid 107, *N. tabacum* Bel-W3, *N. tabacum* 79-615, *N. tabacum* Samsun Holmes NN, F4 from cross *N. tabacum* BU21 x *N. tabacum* Hoja Parado, line 97, *N. tabacum* KTRDC#2 Hybrid 49, *N. tabacum* KTRDC#4 Hybrid 1 10, *N. tabacum* Burley 21, *N. tabacum* PM016, *N. tabacum* KTRDC#5 KY 160 SI, *N. tabacum* KTRDC#7 FCA, *N. tabacum* KTRDC#6 TN 86 SI, *N. tabacum* PM021, *N. tabacum* K 149, *N. tabacum* K 326, *N. tabacum* K 346, *N. tabacum* K 358, *N. tabacum* K 394, *N. tabacum* K 399, *N. tabacum* K 730, *N. tabacum* KY 10, *N. tabacum* KY 14, *N. tabacum* KY 160, *N. tabacum* KY 17, *N. tabacum* KY 8959, *N. tabacum* KY 9, *N. tabacum* KY 907, *N. tabacum* MD 609, *N. tabacum* McNair 373, *N. tabacum* NC 2000, *N. tabacum* PG 01, *N. tabacum* PG 04, *N. tabacum* P01, *N. tabacum* P02, *N. tabacum* P03, *N. tabacum* RG 11, *N. tabacum* RG 17, *N. tabacum* RG 8, *N. tabacum* Speight G-28, *N. tabacum* TN 86, *N. tabacum* TN 90, *N. tabacum* VA 509, *N. tabacum* AS44, *N. tabacum* Banket A1, *N. tabacum* Basma Drama B84/31, *N. tabacum* Basma I Zichna ZP4/B, *N. tabacum* Basma Xanthi BX 2A, *N. tabacum* Batek, *N. tabacum* Besuki Jember, *N. tabacum* C104, *N. tabacum* Coker 319, *N. tabacum* Coker 347, *N. tabacum* Criollo Misionero, *N. tabacum* PM092, *N. tabacum* Delcrest, *N. tabacum* Djebel 81, *N. tabacum* DVH 405, *N. tabacum* Galpao Comum, *N. tabacum* HB04P, *N. tabacum* Hicks Broadleaf, *N. tabacum* Kabakulak Ellassona, *N. tabacum* PM102, *N. tabacum* Kutsage E1, *N. tabacum* KY 14xL8, *N. tabacum* KY 171, *N. tabacum* LA BU 21, *N. tabacum* McNair 944, *N. tabacum* NC 2326, *N. tabacum* NC 71, *N. tabacum* NC 297, *N. tabacum* NC 3, *N. tabacum* PVH 03, *N. tabacum* PVH 09, *N. tabacum* PVH 19, *N. tabacum* PVH 2110, *N. tabacum* Red Russian, *N. tabacum* Samsun, *N. tabacum* Saplak, *N. tabacum* Simmaba, *N. tabacum* Talgar 28, *N. tabacum* PM132, *N. tabacum* Wislica, *N. tabacum* Yayaldag, *N. tabacum* NC 4, *N. tabacum* TR Madole, *N. tabacum* Prilep HC-72, *N. tabacum* Prilep P23, *N. tabacum* Prilep PB 156/1, *N. tabacum* Prilep P12-2/1, *N. tabacum* Yaka JK-48, *N. tabacum* Yaka JB 125/3, *N. tabacum* TI-1068, *N. tabacum* KDH-960, *N. tabacum* TI-1070, *N. tabacum* TW136, *N. tabacum* PM204, *N. tabacum* PM205, *N. tabacum* Basma, *N. tabacum* TKF 4028, *N. tabacum* L8, *N. tabacum* TKF 2002, *N. tabacum* TN90, *N. tabacum* GR141, *N. tabacum* Basma xanthi, *N. tabacum* GR149, *N. tabacum* GR153, 및 *N. tabacum* Petit Havana. 상기 개시된 조성물 및 방법은 *N. 루스티카* 및 *N. 타바쿰*(예를 들어, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1 및 Petico)을 포함해서, 니코티아나 속의 임의의 종에 적용될 수 있다. 다른 종은 *N. acuminata*, *N. acuminata* var. *multiflora*, *N. alata*, *N. amplexicaulis*, *N. arentsii*, *N. benavidesii*, *N. benthamiana*, *N. bigelovii*, *N. bonariensis*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. debneyi*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. fragrans*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. goodspeedii*, *N. gossei*, *N. hybrid*, *N. ingulba*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffii*, *N. linearis*, *N. longiflora*, *N. megalosiphon*, *N. miersii*, *N. noctiflora*, *N. nudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis*, *N. occidentalis* subsp. *hesperis*, *N. otophora*, *N. paniculata*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. raimondii*, *N. repanda*, *N. rosulata*, *N. rosulata* subsp. *ingulba*, *N. rotundifolia*, *N. setchellii*, *N. simulans*, *N. solanifolia*, *N. spegazzinii*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. thyrsoiflora*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. trigonophylla*, *N. umbratica*, *N. velutina*, *N. wigandioides*, 및 *N. x sanderae*를 포함하고 있다.
- [0116] 또한 담배 재배품종 및 엘리트(elite) 담배 재배품종의 용도도 본원에서 고려된다. 특히 유용한 니코티아나 타바쿰 변종은 버얼리종, 다크종(dark type), 황색종, 및 오리엔탈형 담배를 포함하고 있다. 변종 또는 재배품종의 비-제한적인 예로는 다음과 같다: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC Galpao tobacco, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Hybrid 403LC,

Hybrid 404LC, Hybrid 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KTY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC ‘ ‘Periq’ e’ tobacco, PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B 13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC number 2 Hybrid 49, Burley 21, KY 8959, KY 9, MD 609, PG 01, PG 04, PO1, PO2, PO3, RG 11, RG 8, VA 509, AS44, Banket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpao Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Ellassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. 본원에서 특정하게 식별되지 않는다고 하더라도 상기한 것들의 낮은 컨버터 아변중도 또한 고려된다.

[0117] 다음의 실시예들은 예시로서 제공되며 한정으로서 제공되는 것이 아니다. 달리 명시하지 않으면, 본 발명은 분자 생물학 및 식물 생물학의 종래 기술 및 방법들을 채택한다.

[0118] 실시예

[0119] 실시예 1

[0120] 담배 내의 유리된 NNK 및 매트릭스-결합된 NNK의 분석 방법

[0121] 담배 샘플들(예를 들면, 약 750mg)의 부분 표본들을 대략 실온에서 약 1시간 동안 흔들어서 약 30mL의 Tris-HCl 버퍼(50mM; pH 7.4)로 추출한다. 내부 표준(100 ng/mL NNK-d₄)을 첨가한다. 추출물들의 샘플들(0.4mL)을 0.2 μM 필터를 사용하여 여과시키고, 초고성능 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(UPLC-MS/MS)을 사용하여 NNK 함량을 분석한다. 이들 추출 농도로부터 계산된 샘플 농도는 샘플 내의 “유리된 NNK” 농도에 대응한다. 추출 혼합물들을 처리하고(예를 들면, 약 4시간 동안 약 130℃로 가열하여) 추출물들의 부분 표본들을 여과시킨 후, UPLC-MS/MS에 의해 NNK 농도를 재차 측정한다. 이들 값들로부터, 샘플들 내의 “총 NNK” 농도를 계산할 수 있다. “매트릭스-결합된 NNK” 농도는 “총 NNK” 농도와 “유리된 NNK” 농도 간의 차이이다.

[0122] “총 NNK” 추출을 위한 대안적인 방법은 농축된 HCl(예를 들면, 30mL에 첨가된 37% HCl의 3mL)과의 추출 혼합물들의 산성화(acidification) 및 80℃에서 48시간 동안의 배양(incubation)을 포함하고 있다. 산성 추출물들은 320 μL의 추출물에 NaOH용액(6N, 40 μL) 및 수산화마그네슘 현탁액(10%; 40 μL)을 첨가하여 여과 및 UPLC 분석 전에 중화된다.

[0123] 실시예 2

[0124] UPLC 분석

[0125] 사용된 컬럼(column)은 Waters Acquity BEH C18, 1.7 μm, 2.1X50mm이다. 사용된 용리제들은, (A) 중탄산 암모늄(10mM; 암모니아로 pH 9.8로 조절됨) + 2%(v/v) 아세트오니트릴; (B) 아세트오니트릴이다. 사용된 구배(gradient)는 0min - 5% B; 0.5min - 5% B; 3.3min -18.3% B이다. 사용되는 유량(flow)은 0.5mL/min이다. 사용되는 컬럼 온도는 50℃이다.

[0126] 실시예 3

[0127] MS/MS 방법론

[0128] 이러한 분석은 다음의 MRM 이행들을 사용하여 Waters TQ 스펙트로미터 상에서 수행된다: NNK: 208.2 → 122.2; 체류 시간(dwel1 time) 100ms; NNK-d₄: 212.2 → 126.2; 체류 시간 100ms; 모세관 전압(capillary voltage):

0.6kV; 콘 전압(cone voltage): 25V; 충돌 에너지(collision energy): 11 eV; 소스 온도(source temperature): 120℃; 탈용매화 온도(desolvation temperature): 400℃; 탈용매화 가스 흐름: 800 L/h.

[0129] 실시예 4

[0130] 버얼리종 줄기의 리그닌화 및 비리그닌화 조직들의 매트릭스-결합 NNK의 분포

[0131] 건조된 버얼리종 담배 잎의 주맥의 약 2g을 손으로 내측 리그닌화 조직(총 건식 중량의 36%)과 외측 비리그닌화 조직(총 건식 중량의 64%)으로 분리한다. 이러한 샘플들의 각각에 있어서, 전술한 바와 같이, 유리된 NNK와 총 NNK의 농도를 UPLC-MS에 의해 분석한다. 매트릭스-결합 NNK를 유리된 NNK와 총 NNK 농도 간의 차로서 산출한다. 티올글리콜산에 의한 유도체화에 기초하는 광도측정법을 이용하여 리그닌 함량을 정량화한다(참조 Brinkmann 등 (2002) J. Chem. Ecol. , 28, 2483-2501).

[0132] 도 1의 결과는, 건조된 버얼리종 줄기의 리그닌화(L) 및 비리그닌화(NL) 조직의 유리된 NNK, 매트릭스-결합 NNK 및 리그닌의 분포를 나타낸다. 도 2는 리그닌화(L) 및 비리그닌화(NL) 조직들을 도시하는 수화 건조된 버얼리종 줄기의 단면도이다. 리그닌화 조직은 플로로글루시놀에 의해 붉은 색으로 염색되어 있다. 도 3의 결과는, 아질 산나트륨 용액에 의한 니트로소화 후의 녹색 주맥의 리그닌화 및 비리그닌화 조직들의 매트릭스-결합 NNK 함량을 도시한다.

[0133] 이러한 결과들은, 매트릭스-결합 NNK가 버얼리종 담배 줄기와 주맥의 리그닌화 조직들에 주로 분포됨을 나타낸다.

[0134] 실시예 5

[0135] 동결 건조, 분쇄, 및 크기 분리에 의해 버얼리종 줄기로부터의 결합-NNK 함량이 낮은 부분의 농축

[0136] 버얼리종 줄기(52g)의 샘플을 물(350mL)로 습윤화하고 동결 건조한다. 형성되는 재료(12g)의 일부를 스틸 볼(2개의 볼, 직경 2cm, 300rpm, 15분)로 셰이킹하여 분쇄하고, 사별 셰이커로 1mm 초과 내지 0.25mm 미만 범위에 걸쳐 입자 크기가 서로 다른 부분들로 분리한다.

[0137] 도 4와 표 1는, 분쇄되어 동결-건조된 버얼리종 줄기의 사별 부분들에 있어서 유리된 및 매트릭스-결합 NNK, NNN, 리그닌 및 니코틴 수준들을 도시한다. 도 5와 표 1의 유리된 및 매트릭스-결합 NNK의 분석은, 리그닌 함량(각 부분의 건식 중량%)과 매트릭스-결합 NNK 함량 모두가, 0.5mm 내지 0.85mm, 0.85mm 내지 1mm 및 1mm 초과인 입자 크기의 부분들을 포함하여 0.5mm를 초과하는 입자 크기의 부분들에 있어서 감소됨을 나타낸다. 도 5는, 리그닌 함량이 매트릭스-결합 NNK와 잘 상관되며 이에 따라 리그닌과 매트릭스-결합 NNK의 공동 위치지정을 확인함을 도시한다.

[0138] 실시예 6

[0139] 녹색 TN90 주맥과 버얼리종 줄기에서의 매트릭스-결합 NNK 전구체의 위치지정

[0140] TN90 주맥의 후벽 및 비후벽 조직에서의 매트릭스-결합 NNK의 상대 분포를 측정한다. 매트릭스-결합 NNK가 리그닌에 결합되는 것으로 예측함으로써, 리그닌화 후벽 조직에서의 이 전구체의 높은 농도를 예측한다. 제2 실험에서는, (건조된) 버얼리종 줄기의 후벽 및 비후벽 조직의 유리된 및 매트릭스-결합 NNK의 상대 분포를 조사한다.

[0141] 재료 & 방법

[0142] 녹색 주맥

[0143] 15개의 성숙한 TN90 잎의 주맥(근위측 절반만)을 후벽 조직(S) (주맥의 “중심”) 및 비후벽 조직(NS)에서 수동으로 분리한다. 양측 모두를 동결 건조시키고 미세하게 분쇄한다. 메탄올/물 1:3의 40mL에 의해 1g을 각각 3번 추출하여(1시간 동안 실온) 2개 재료의 비수용성 부분을 결정하고, 동결 건조 후 (SW와 NSW로 지정된) 비수용성 재료를 계량한다. 다음에 따르는 방법을 이용하여 S 및 NS(n=5)에서의 의사-옥시니코틴(PON) 및 니코틴 분석을 측정한다. 45분 동안 실온에서 PON-메틸- d_3 을 내부 표준(200ng/mL)으로서 함유하는 메탄올/물(4:1)에 의한 셰이킹에 의해, 미세 분말인 식물 재료(~20mg)를 추출한다. 여과(0.2 μ m) 후에, 다음에 따르는 조건들을 사용하여 샘플들을 LC-MS 분석을 거치게 한다. 컬럼: 액티브 UPLC BEH C18 컬럼(1.7 μ m, 50 \times 2.1mm; 물); 컬럼 온도: 50℃; 용리제: 아세토니트릴(98:2, v/v; 용리제 A); 아세토니트릴(용리제 B); 로 0분 - 0% B, 0.5mL/분; 0.5분 - 0% B, 0.5mL/분; 6분 - 30% B, 0.5mL/분; MS 검출: PON m/z 179.2 a m/z 106.1; PON-메틸- d_3 m/z 182.2 a m/z 106.1; UV 검출: 260nm을 이용한 NH_3 을 사용하여 pH 9.8로 조정된 수용성 암모늄 탄산수소염 PON 및 니코틴은,

각각 2.6분과 4.1분 후에 용리된다. 니코틴 정량화를 위해, 260nm에서의 피크 영역 및 외부 캘리브레이션을 사용한다. S, NS, SW, NSW에서의 매트릭스-결합 NNK 전구체의 함량을 추정하도록, 이러한 재료들의 부분 표본들 (~20 mg; n=5)을, 실온에서 4시간 동안 NaNO₂-용액(1.5mL (물 내의 10 mg/mL))에서의 배양에 의해 니트로소화 하고, 10mL 물로 4번 세척/원심 분리한다. 이어서, 각 니트로소화 샘플의 원심 분리 침전물을 4mL 트리스-HCl 버퍼(50mM pH 7.5; 100ng/mL에서의 NNK-d4 및 NNN-d4) 내에 차지하게 하고, (130℃에서 4시간 동안) 오토클레이빙하고, 본원에서 설명하는 방법들을 이용하여 NNK 함량을 분석한다.

[0144] 건조된 버얼리종 줄기

[0145] 버얼리종 줄기 샘플(2g = 4개의 ~5cm 조각)을, 외측(비리그닌화) 조직(CNS)과 내측(리그닌화) 부분(CS)으로 수동 분리한다. 양측 샘플을 혼합기 밀(2.5분, 50 s⁻¹ 동안 Retsch "Tissuelyzer")에서 미세 분쇄한다. 그 결과, CNS와 CS 분말이 각각 1183mg 및 651mg으로 된다. 2개 샘플의 유리된 NNK를, 실온에서 1시간 동안 1.5mL 트리스-버퍼(+IS)에 의해 ~50mg 부분 표본(n=5)을 추출한 후에 결정한다. 5mL 트리스-버퍼(+IS)의 ~50mg 부분 표본(n=5)의 오토클레이빙 추출(4시간 동안 130℃) 후에 총 NNK를 결정한다.

[0146] 결과

[0147] 이 실험의 결과를 도 2 및 표 6에 보여주고 있다. 니트로소화 및 세척 후에, 매트릭스-결합 NNK의 7배 높은 농도를 주맥(NS)의 외층에 비해 후벽 조직(S)에서 발견하게 된다. PON 및 니코틴 모두는, S보다는 NS에서 2배 높다. 이러한 인공적 니트로소화 실험의 결과는, 상업적으로 건조된 버얼리종 줄기 샘플의 리그닌화(CS) 및 비리그닌화(CNS) 부분들에서의 결합-NNK 수준에 의해 입증된다. 유리된 NNK는 CS에서 2배 높지만, 매트릭스-결합 NNK는 CS에서 7배 높다. 니코틴 및 NNN 수준들은 CNS보다 CS에서 높고 NNK보다는 낮다.

[0148] 결론

[0149] 녹색 주맥의 리그닌화 후벽 조직에 매트릭스-결합 NNK 전구체의 고 농도가 존재하는 것은, 매트릭스-결합 NNK가 리그닌에 공유 결합 또는 비공유 결합됨을 나타낸다.

[0150] 본원에 인용된 또는 설명된 간행물은 이전에 본 출원의 출원일에 앞서 공개된 관련 정보를 제공한다. 본원에서 언급된 것은 그러한 공개에 선행하지 않음을 발명자가 인정하는 것으로 해석되지 않는다. 상기 명세서에서 언급된 모든 간행물은 본원에 참조로 인용된다. 발명의 다양한 조절 및 변형은 발명의 범위 및 의미에서 벗어나지 않으며 본 기술분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 발명이 특정한 구현예들과 관련하여 설명되었지만, 청구범위에 기재된 발명은 특정한 구현예들에 부당하게 한정되지 않아야 하는 것이 이해되어야 한다. 실제로, 세포적, 분자적 및 식물 생물학 또는 관련 분야의 본 기술분야의 숙련자에게 명백한 것을 포함하는, 본원 발명을 실시하기 위하여 기술된 모드들의 다양한 변형들이 이하의 청구범위에 포함된다.

표 1

사별 부분	총 중량의 부분[%]	유리된 NNK[ng/g]	NNN [ng/g]	NIC [ug/g]	결합된 NNK [ng/g]	리그닌 [% d.w.]
A: >1mm	16	200	1098	2091	1606	2.92
A: 0.85-1mm	4	251	1269	2307	1905	4.41
A: 0.5-0.85mm	16	328	1690	2608	3500	6.33
A: 0.25-0.5mm	27	463	2305	2937	6218	11.31
A: <0.25mm	38	297	1732	3237	2936	4.81
합계		329	1760	2839	3651	6.47

[0151]

표 2

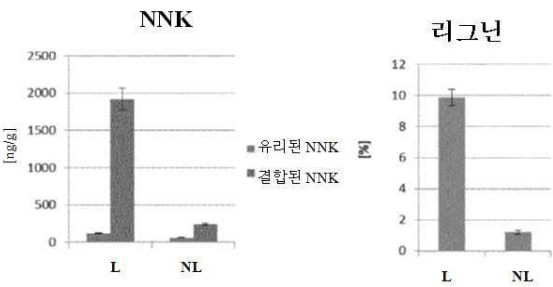
	생 중량 [g]	건조 중량 [g]	건조 물질 [mg]	세척 전 [mg]	세척 후 [mg]	수 불용성 [% 건조 중량]	수 불용성 [% 생]
S	25	3.1	12.4	1010	668	66	8.2
NS	171	11	6.4	1010	414	41	2.6
CS		0.65					
CNS		1.18					

샘플	PON [ug/g]	NIC [ug/g]	PON/NIC *1000	오토클레이빙 후 NNK [mg/g]	NNN [ng/g]	유리된 NNK [ng/g]
S		265		13245	1660	
NS		116		184	111	
SW		331		17610	1595	
NSW		109		326	272	
PON-S	6.8	784	8.63			
PON-NS	14.0	1909	7.32			
유리된 CS		9496			1356	120
유리된 CNS		7985			895	64
총 CS		8459		2038		
총 CNS		7057		310		

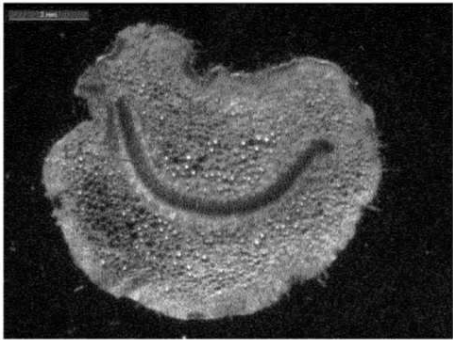
[0152]

도면

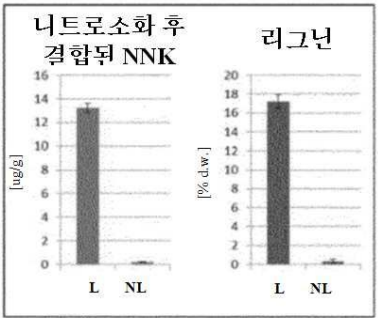
도면1



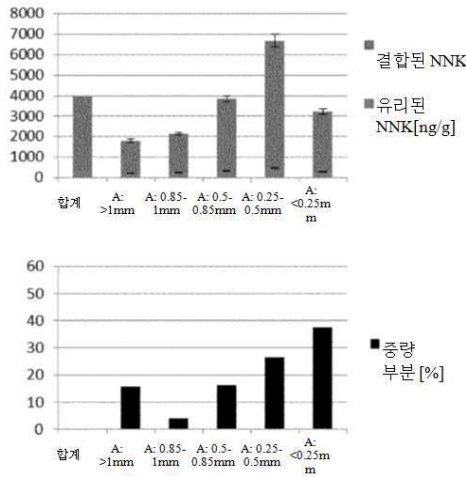
도면2



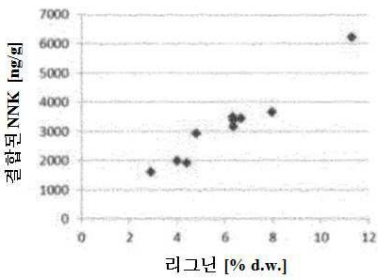
도면3



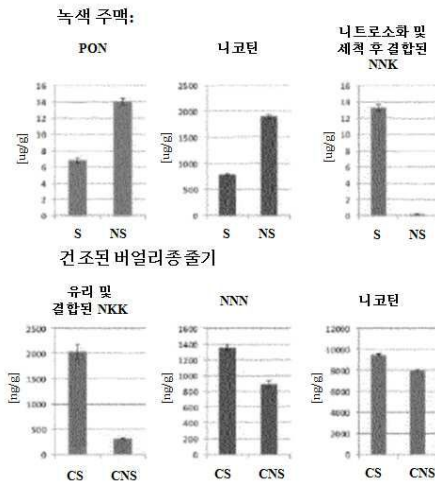
도면4



도면5



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 14

【변경전】

건조된 담배 식물 재료로서, 내부의 리그닌 양이 감소되지 않은 대조군 담배 식물 재료에 비해 감소된 수준의 리그닌을 포함하고 있고, 여기서 건조된 담배 식물 재료 내부의 리그닌 양은 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 분리하여 감소되었고, 여기서 매트릭스-결합 NNK의 양이 3500 ng/g 이하이고,

여기서 유리된 NNK의 양이 330ng/g 미만, 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만, 여기서 니코틴 함량은 2610 μg/g 미만, 또는 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만 및 니코틴 함량은 2610 μg/g 미만이고;

여기서 상기 건조된 담배 식물 재료는 식물 외피층 같은 식물 피층을 포함하거나, 그것으로 이루어지고; 또는

여기서 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들의 조합이 상기 건조된 식물 조직에 실질적으로 부존재하는, 건조된 담배 식물 재료.

【변경후】

건조된 담배 식물 재료로서, 내부의 리그닌 양이 감소되지 않은 대조군 담배 식물 재료에 비해 감소된 수준의 리그닌을 포함하고 있고, 여기서 건조된 담배 식물 재료 내부의 리그닌 양은 비리그닌화 조직으로부터 리그닌화 조직을 기계적으로 분리하여 감소되었고, 여기서 매트릭스-결합 NNK의 양이 3500 ng/g 이하이고,

여기서 유리된 NNK의 양이 330ng/g 미만, 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만, 여기서 니코틴 함량은 2610 μg/g 미만, 또는 여기서 NNN 함량은 1700ng/g 미만 및 니코틴 함량은 2610 μg/g 미만이고;

여기서 상기 건조된 담배 식물 재료는 식물 외피층 같은 식물 피층을 포함하거나, 그것으로 이루어지고; 또는

여기서 관다발 또는 물관부 또는 리그닌화 후벽 조직 또는 이들의 조합이 상기 건조된 식물 조직에 실질적으로 부존재하는, 건조된 담배 식물 재료.