

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6444992号
(P6444992)

(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)

(51) Int. Cl.

F 1

A 2 4 B 15/26 (2006.01)
A 2 3 J 1/00 (2006.01)
A 2 3 L 33/10 (2016.01)
A 2 3 L 33/17 (2016.01)
C O 7 K 14/415 (2006.01)

A 2 4 B 15/26
A 2 3 J 1/00
A 2 3 L 33/10
A 2 3 L 33/17
C O 7 K 14/415

B

請求項の数 17 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-514114 (P2016-514114)
(86) (22) 出願日 平成26年5月16日 (2014.5.16)
(65) 公表番号 特表2016-521976 (P2016-521976A)
(43) 公表日 平成28年7月28日 (2016.7.28)
(86) 国際出願番号 PCT/US2014/038342
(87) 国際公開番号 W02014/186671
(87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014.11.20)
審査請求日 平成29年4月28日 (2017.4.28)
(31) 優先権主張番号 13/896,656
(32) 優先日 平成25年5月17日 (2013.5.17)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 594112886
アール・ジェイ・レイノルズ・タバコ・カンパニー
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27102、ウインストン・セイラム、ノース・メイン・ストリート・401
(74) 代理人 110001173
特許業務法人川口国際特許事務所
(72) 発明者 ジェラルディ、アンソニー・リチャード
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27104、ウインストン・セーラム、マウンテン・ビュー・ロード・5208

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タバコ由来のタンパク質組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

植物由来のタンパク質濃縮材料における灰またはアルカロイド含有量を低減するための方法であって、

a) Ru B i s C O、F 2 分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、望ましくない灰、ニコチン、またはそれらの組み合わせをさらに含む、植物由来のタンパク質濃縮材料、を受け取ることと、

b) 溶媒中に前記植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて塩基性 pH を有する溶液を形成することと、

c) 前記植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を 1 つ以上の限外濾過膜に通過させることによって、前記溶液を透析濾過に供して、前記植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、低減された量の灰、ニコチン、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質濃縮物または単離物を含む残余物を得ることと、を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記溶媒が水性である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 3】

前記植物由来のタンパク質濃縮材料が、ニコチアナ (N i c o t i a n a) 種の植物からの材料を含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 4】

前記植物由来のタンパク質濃縮材料が、少なくとも約 40% の Ru B i s C O、F 2 分

10

20

画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 5】

前記植物由来のタンパク質濃縮材料が、スプレー乾燥または凍結乾燥の形態である、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 6】

前記 1 つ以上の限外濾過膜が、約 1 k D a ~ 約 1 5 0 k D a の分子量カットオフを有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 7】

前記供する工程が、前記溶液を、約 5 k D a の分子量カットオフを有する限外濾過膜に通過させることを含む、請求項 1 に記載の前記方法。

10

【請求項 8】

前記タンパク質濃縮物または単離物が、前記植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約 2 5 % 低減されている灰含有量を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 9】

前記タンパク質濃縮物または単離物が、約 1 0 重量 % 未満の灰含有量を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 0】

前記タンパク質濃縮物または単離物が、約 5 μ g / g 未満のニコチン含有量を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 1】

20

前記タンパク質濃縮物または単離物が、約 1 μ g / g 未満のニコチン含有量を有する、請求項 1 に記載の前記方法。

【請求項 1 2】

溶液中の植物由来のタンパク質濃縮材料を官能化樹脂と接触させて、銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの 1 つ以上の量を低減することによって、工程 b) 前の前記植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部、または工程 c) の後の前記残余物を処理することをさらに含み、特に、

前記接触工程が、前記植物由来のタンパク質濃縮材料溶液または前記残余物を前記官能化樹脂と共にかき混ぜること、前記植物由来のタンパク質濃縮材料溶液または残余物及び前記官能化樹脂を攪拌すること、または前記植物由来のタンパク質濃縮材料溶液または残余物を、前記官能化樹脂を含むカラムに通過させること、を含む、請求項 1 に記載の前記方法。

30

【請求項 1 3】

前記官能化樹脂が、トリアミンテトラ酢酸基またはその塩で官能化された樹脂を含む、請求項 1 2 に記載の前記方法。

【請求項 1 4】

前記タンパク質濃縮物または単離物が、前記植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約 2 5 % 低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの 1 つ以上を有する、請求項 1 2 に記載の前記方法。

【請求項 1 5】

40

前記タンパク質濃縮物または単離物が、前記植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約 5 0 % 低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの 1 つ以上を有する、請求項 1 2 に記載の前記方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の前記方法に従って得られた、タンパク質濃縮物または単離物。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の前記タンパク質濃縮物または単離物を含む、栄養補助食品、食品、飲料、パーソナルケア品目、薬学的製品、またはペットフード。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、主に、タバコから作製される、もしくはそれに由来する、またはそうでなければタバコもしくはタバコの成分を組み込み、ヒト消費を意図する製品に関する。特に注目されるのは、ニコチアナ (Nicotiana) 種からの植物もしくは植物の部分から得られる、またはそれに由来する原料もしくは成分である。

【背景技術】

【0002】

タバコの多くの使用法が提案されている。例えば、タバコは、パイプで喫煙されており、また、タバコは、紙巻タバコ及び葉巻で喫煙するために使用されている。例えば、Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (編) 346頁(1999)を参照されたい。近年、喫煙感覚のうちの多くを提供するが、タバコを燃焼させることから生じる相当量の不完全燃焼及び熱分解生成物を送達することのない、様々な方法が提案されている。例えば、Borschkeらの米国特許第7,503,330号、Robinsonらの同第7,726,320号に記載されている背景技術、ならびに2013年3月15日出願されたNovak, IIIらの米国特許出願第13/840,264号、及び2012年10月9日出願されたGerardiの同第13/647,670号を参照されたい。タバコはまた、いわゆる無煙状態で楽しられている。例えば、Byrdらの米国特許公開第2012/0272976号に記載されている背景技術を参照されたい。さらに、タバコ由来の様々な材料が、ある特定の工業用途において使用できることが提案されている。例えば、Reslerの米国特許第2,098,836号、Hockenyosの同第2,232,662号、Wildmanらの同第4,347,324号、及びWildmanらの同第4,289,147号、ならびにDeValの米国特許公開第2011/01287681号及びColemanらの同第2012/0260929号を参照されたい。

【0003】

タバコ及びタバコ成分からタンパク質を抽出する方法は、2013年3月14日出願されたMuaらの米国特許出願第13/830,063号において提案されている。喫煙物品及び／または無煙タバコ製品の製造に有用なタバコ配合物における使用のため、ならびに栄養補助食品等の他の製品への組み込みのために、精製されたタバコ由来のタンパク質組成物を提供することが望ましいであろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第7503330号明細書

【特許文献2】米国特許第7726320号明細書

【特許文献3】米国特許出願第13/840264号明細書

【特許文献4】米国特許出願第13/647670号明細書

【特許文献5】米国特許公開第2012/0272976号明細書

【特許文献6】米国特許第2098836号明細書

【特許文献7】米国特許第2232662号明細書

【特許文献8】米国特許第4347324号明細書

【特許文献9】米国特許第4289147号明細書

【特許文献10】米国特許公開第2011/01287681号明細書

【特許文献11】米国特許公開第2012/0260929号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (編) 346頁(1999)

【発明の概要】

【0006】

本発明は、植物、特に、ニコチアナ種の植物に由来する材料を提供する。好ましい実施形態において、これらの材料は、精製形態であると考えられ得るものが提供される。本発明はまた、植物、例えば、ニコチアナ種から成分を抽出するための方法、及びこれらの成分を処理するための方法も提供する。特に、本発明は、タバコ材料由来のタンパク質濃縮物、単離物、及び他の形態の製品、そのようなタンパク質濃縮物、単離物、及び他の形態の製品を得るための方法、ならびに様々な種類の組成物へのそのようなタンパク質濃縮物、単離物、及び他の形態の製品の組み込みのための方法を提供する。

【0007】

本発明の一態様において、タンパク質濃縮材料中の望ましくない成分の含有量を低減させるための方法が提供され、本方法は、a) RuBiSCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを（例えば、少なくとも約40重量%の量で）含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、望ましくない成分をさらに含む、植物由来のタンパク質濃縮材料を得ること、b) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶液を形成すること、及びc) 植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を1つ以上の限外濾過膜に通過させることによって、この溶液を透析濾過に供して、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、低減された量の望ましくない成分を有するタンパク質濃縮物または単離物を含む残余物を得ること、を含む。好ましい実施形態において、望ましくない成分は、灰、金属、粒子状固体、アルカロイド（例えば、ニコチン）等を含む。

【0008】

上述の方法に関しては、透析濾過の具体的なパラメータは、変動し得る。例えば、いくつかの実施形態における溶媒は、水性の性質を有する液体（例えば、精製水、脱イオン水、水道水等を含む水）を含み得る。いくつかの実施形態において、溶媒は、塩基性である（7を超えるpHを有する）。植物由来のタンパク質濃縮材料は異なり得、ある特定の実施形態において、ニコチアナ種の植物からの材料を含む。限外濾過膜は、いくつかの実施形態において、約1kDa～約150kDaの分子量カットオフを有する。例えば、限外濾過膜は、約5kDaの分子量カットオフを有し得る。

【0009】

そのような方法に従って、タンパク質濃縮物または単離物は、いくつかの実施形態において、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約25%低減されている灰含有量を有する。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、約10重量%未満の灰含有量を有する。そのような方法に従って、タンパク質濃縮物または単離物は、いくつかの実施形態において、約5μg/g未満のニコチン含有量を有する。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、約1μg/g未満のニコチン含有量を有する。

【0010】

本発明の別の態様において、タンパク質濃縮材料中の望ましくない成分の含有量を低減させるための方法が提供され、本方法は、a) RuBiSCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを（例えば、少なくとも約40重量%の量で）含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、望ましくない成分をさらに含む、植物由来のタンパク質濃縮材料、を得ること、b) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶液を形成すること、c) 植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を官能化樹脂と接触させて、低減された量の望ましくない成分の含有量を有するタンパク質濃縮物または単離物を含む処理溶液を得ること、及びd) 処理溶液を官能化樹脂から分離すること、を含む。上述の方法の好ましい実施形態において、望ましくない成分は、銅、カドミウム、鉛、ニッケル、及びそれらの組み合わせ等の重金属である。

【0011】

上述の方法に関しては、接触工程の具体的なパラメータは、変動し得る。例えば、いくつかの実施形態における溶媒は、水性の性質を有する液体（例えば、精製水、脱イオン水、水道水等を含む水）を含み得る。いくつかの実施形態において、溶媒は、塩基性である

(7を超える pHを有する)。植物由来のタンパク質濃縮材料は異なり得、ある特定の実施形態において、ニコチアナ種の植物からの材料を含む。ある特定の実施形態において、接触工程は、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を官能化樹脂と共にかき混ぜることを含む。他の実施形態において、接触工程は、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を、官能化樹脂を含むカラムに通過させることを含む。

【0012】

官能化樹脂の構成は、異なり得る。例えば、官能化樹脂は、トリアミンテトラ酢酸基またはその塩（例えば、トリアミンテトラ酢酸ナトリウム塩基）で官能化された樹脂を含み得る。接触工程は、任意に、高温（例えば、ほぼ室温から約80℃）で行われ得る。接触工程は、任意に、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液及び官能化樹脂を、（例えば、かき混ぜる、振とうする、またはそれらの組み合わせによって）攪拌することを含み得る。

10

【0013】

そのような方法に従って、タンパク質濃縮物または単離物は、いくつかの実施形態において、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約25%低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有し得る。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約50%低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有する。

【0014】

本発明のさらなる態様において、タンパク質濃縮材料中の官能特性（例えば、臭気及び／または風味特性）を改変するための方法が提供され、本方法は、a) RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを（例えば、少なくとも約40重量%の量で）含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、当初の臭気または風味をさらに示す、植物由来のタンパク質濃縮材料、を得ること、b) 溶媒が超臨界状態である間に溶媒によりタンパク質濃縮抽出物からの成分を抽出して、改変された臭気及び／または風味を有するタンパク質濃縮物または単離物を得ること、ならびにc) タンパク質濃縮物または単離物を未抽出残渣から分離すること、を含む。いくつかの好ましい実施形態において、官能特性の改変は、臭気の低減を含む。いくつかの好ましい実施形態において、官能特性の改変は、風味特性の改変を含む。

20

【0015】

上述の方法に関して、超臨界抽出に供された植物由来のタンパク質濃縮材料は、例えば、スプレー乾燥または凍結乾燥の形態で提供され得る。本方法は、任意に、抽出工程前に植物由来のタンパク質濃縮材料を水で湿らせて、約1重量%～約50重量%の水分を有する植物由来のタンパク質濃縮材料を得ることをさらに含み得る。抽出溶媒は、いくつかの実施形態において、超臨界二酸化炭素を含み得る。溶媒は、任意に、最大約30容量%の量で改質剤を含み得る。例示的な改質剤としては、エタノール、1-ブタノール、イソプロパノール、メタノール、1-プロパノール、及びそれらの混合物からなる群が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0016】

ある特定の実施形態において、処理後、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、塩味の減少を特徴とする。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、ニコチンの減少を特徴とする。例えば、いくつかの実施形態において、本方法は、少なくとも約80%のニコチンの低減を提供し得る。

40

【0017】

本発明のなおさらなる態様において、タンパク質濃縮材料の望ましくない成分の含有量を低減させる及び／または官能特性を改変させるための方法が提供され、本方法は、RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせ（例えば、少なくとも約40乾燥重量%の量で）を含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、灰、ニコチン、重金属、臭気、風味、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上の望

50

まししくない特性または不純物をさらに含む、植物由来のタンパク質濃縮材料、を提供することを含み、次の工程、a) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶媒を形成し、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を1つ以上の限外濾過膜に通過させることによって、この溶液を透析濾過に供して、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、低減された量の灰、ニコチン、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質濃縮物または単離物を含む残余物を得る工程、b) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶液を形成し、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を官能化樹脂と接触させて、低減された量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有するタンパク質濃縮物または単離物を含む処理溶液を得、処理溶液を官能化樹脂から分離する工程、ならびにc) 溶媒が超臨界状態である間に溶媒によりタンパク質濃縮抽出物からの成分を抽出して、改変された臭気、風味、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質濃縮物または単離物を得、タンパク質濃縮物または単離物を未抽出残渣から分離する工程、のうちの1つ以上をさらに含む。

10

【0018】

また、本明細書に記載される方法のいずれかに従って得られたタンパク質濃縮物または単離物も、本開示に従って提供される。本発明の他の態様は、そのような方法に従って提供されたタンパク質濃縮物または単離物を含む栄養補助食品、食品、飲料、パーソナルケア品目、薬学的製品、またはペットフードを提供する。

【0019】

一態様において、本発明は、ニコチアナ種の植物から抽出されたRuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含むタンパク質濃縮物または単離物の形態でタンパク質組成物を提供し、タンパク質濃縮物または単離物は、a) 乾燥重量基準で約15重量%未満（例えば、乾燥重量基準で約10重量%未満）の灰含有量、b) 約10 $\mu\text{g/g}$ 未満（例えば、約5 $\mu\text{g/g}$ 未満）のニコチン含有量、及びc) 約60 $\mu\text{g/g}$ 未満（例えば、約50 $\mu\text{g/g}$ 未満または約40 $\mu\text{g/g}$ 未満）の重金属含有量、のうちの1つ以上を特徴とする。

20

【0020】

ある特定の実施形態において、本発明のタンパク質組成物中のRuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせの乾燥重量は、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%である。ある特定の実施形態において、本発明のタンパク質組成物中のカドミウム、銅、鉛、及びニッケルの組み合わせた濃度は、約40 $\mu\text{g/g}$ 未満または約20 $\mu\text{g/g}$ 未満である。有利に、本発明のタンパク質組成物は、無臭である。

30

【0021】

なお別の態様において、本発明は、本明細書に記載されるタンパク質組成物を含むか、または本明細書に記載されるプロセスによって作製される栄養補助食品、食品、飲料、パーソナルケア品目、薬学的製品、またはペットフードを提供する。

【0022】

本発明は、制限なく以下の実施形態を含む。

実施形態1：植物由来のタンパク質濃縮材料の含有量または官能特性を改変するための方法であって、RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む植物由来のタンパク質濃縮材料であって、灰、ニコチン、重金属、臭気、味覚、またはそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上の望まししくない特性または不純物をさらに含む、植物由来のタンパク質濃縮材料、を受け取ることを含み、次の工程、a) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶液を形成し、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を1つ以上の限外濾過膜に通過させることによって、この溶液を透析濾過に供して、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、低減された量の灰、ニコチン、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質濃縮物または単離物を含む残余物を得る工程、b) 溶媒中に植物由来のタンパク質濃縮材料の少なくとも一部を溶解させて溶液を形成し、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を官能化樹脂と接触させて、低減さ

40

50

れた量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有するタンパク質濃縮物または単離物を含む処理溶液を得、処理溶液を官能化樹脂から分離する工程、ならびにc) 溶媒が超臨界状態である間に溶媒によりタンパク質濃縮抽出物からの成分を抽出して、改変された臭気、風味、またはそれらの組み合わせを有するタンパク質濃縮物または単離物を得、タンパク質濃縮物または単離物を未抽出残渣から分離する工程、のうちの1つ以上をさらに含む、方法。

実施形態2：溶媒は水性である、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態3：溶媒は、7より大きいpHを有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態4：植物由来のタンパク質濃縮材料は、ニコチアナ種の植物からの材料を含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態5：植物由来のタンパク質濃縮材料は、少なくとも約40%のRuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態6：植物由来のタンパク質濃縮材料は、スプレー乾燥または凍結乾燥の形態である、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態7：方法は、工程a)を含み、1つ以上の限外濾過膜は、約1kDa～約150kDaの分子量カットオフを有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態8：方法は、工程a)を含み、供する工程は、溶液を、約5kDaの分子量カットオフを有する限外濾過膜に通過させることを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態9：方法は、工程a)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約25%低減されている灰含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態10：方法は、工程a)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、約10重量%未満の灰含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態11：方法は、工程a)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、約5μg/g未満のニコチン含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態12：方法は、工程a)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、約1μg/g未満のニコチン含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態13：方法は、工程b)を含み、接触工程は、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を官能化樹脂と共にかき混ぜること、植物由来のタンパク質濃縮材料溶液及び官能化樹脂を攪拌すること、または植物由来のタンパク質濃縮材料溶液を、官能化樹脂を含むカラムに通過させることを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態14：方法は、工程b)を含み、官能化樹脂は、トリアミンテトラ酢酸基またはその塩で官能化された樹脂を含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態15：方法は、工程b)を含み、接触工程はほぼ室温から約80℃の温度で行われる、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態16：方法は、工程b)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約25%低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態17：方法は、工程b)を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、少なくとも約50%低減されている量の銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのうちの1つ以上を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態18：方法は、工程c)を含み、抽出工程前に植物由来のタンパク質濃縮材料を水で湿らせて、約1重量%～約50重量%の水分を有する植物由来のタンパク質濃縮材料を得ることをさらに含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態19：方法は、工程c)を含み、溶媒は、超臨界二酸化炭素を含む、任意の前述

10

20

30

40

50

または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態 20：方法は、工程 c) を含み、溶媒は、最大約 30 容量%の量で改質剤をさらに含む、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態 21：改質剤は、エタノール、1-ブタノール、イソプロパノール、メタノール、1-プロパノール、及びそれらの混合物からなる群から選択される、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態 22：方法は、工程 c) を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、塩味の減少を特徴とする、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

実施形態 23：方法は、工程 c) を含み、タンパク質濃縮物または単離物は、植物由来のタンパク質濃縮材料と比較して、ニコチンの減少を特徴とする、任意の前述または後述の実施形態に記載の方法。

10

実施形態 24：任意の前述または後述の実施形態に記載の方法に従って得られた、タンパク質濃縮物または単離物。

実施形態 25：任意の前述または後述の実施形態に記載の方法に従って得られた、タンパク質濃縮物または単離物を含む、栄養補助食品、食品、飲料、パーソナルケア品目、薬学的製品、またはペットフード。

実施形態 26：ニコチアナ種の植物から抽出された、RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含むタンパク質濃縮物または単離物の形態のタンパク質組成物であって、タンパク質濃縮物または単離物は、a) 約 15 乾燥重量%未満の灰含有量、b) 約 10 $\mu\text{g/g}$ 未満のニコチン含有量、及び c) 約 60 $\mu\text{g/g}$ 未満の重金属含有量、のうちの 1 つ以上を特徴とする、タンパク質組成物。

20

実施形態 27：少なくとも約 70 乾燥重量%の RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 28：少なくとも約 80 乾燥重量%の RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 29：少なくとも約 90 乾燥重量%の RuBisCO、F2分画タンパク質、またはそれらの組み合わせを含む、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

30

実施形態 30：約 10 重量%未満の灰含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 31：約 5 $\mu\text{g/g}$ 未満のニコチン含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 32：約 50 $\mu\text{g/g}$ 未満の重金属含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 33：約 40 $\mu\text{g/g}$ 未満の重金属含有量を有する、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 34：カドミウム、銅、鉛、及びニッケルの組み合わせた濃度が、約 40 $\mu\text{g/g}$ 未満である、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

40

実施形態 35：カドミウム、銅、鉛、及びニッケルの組み合わせた濃度が、約 20 $\mu\text{g/g}$ 未満である、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 36：タンパク質組成物は無臭である、任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物。

実施形態 37：任意の前述または後述の実施形態に記載のタンパク質組成物を含む、栄養補助食品、食品、飲料、パーソナルケア品目、薬学的製品、またはペットフード。

【0023】

本開示のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、下で簡潔に説明される添付の図面と一緒に、以下の詳細な説明を読むことから明らかとなるであろう。本発明は、そのような

50

特徴または要素が、本明細書における特定の実施形態の説明において明示的に組み合わされているかどうかにかかわらず、上記実施形態のうちの2つ、3つ、4つ、またはそれよりも多くの任意の組み合わせ、ならびに本開示に記載される任意の2つ、3つ、4つ、またはそれよりも多くの特徴の組み合わせを含む。本開示は、開示される発明の任意の分離可能な特徴または要素が、その様々な態様及び実施形態のうちのいずれかにおいて、文脈上別途明確な指示がない限り、組み合わせ可能であることが意図されると見なされるべきであるように、総合的に読まれることが意図される。本発明の他の態様及び利点は、以下から明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

本発明の実施形態の理解を提供するために、必ずしも原寸で描かれていない添付の図面が参照され、参照番号は、本発明の例示的な実施形態の成分を指す。図面は単なる例示であり、本発明を制限すると見なされるべきではない。

【図1】紙巻タバコの形態を有する喫煙物品の展開斜視図であり、紙巻タバコの喫煙可能な材料、包装材料成分、及びフィルター要素を示す。

【図2】製品の幅にわたって取られた無煙タバコ製品の実施形態の断面図であり、本発明の無煙タバコ組成物で充填された外部パウチを示す。好ましい実施形態の詳細な説明

【0025】

好ましい実施形態の詳細な説明

ここで本発明は、以降でより完全に説明される。本発明は、しかしながら、多くの異なる形態で具体化されてよく、本明細書に記載される実施形態に限定されると見なされるべきではなく、むしろこれらの実施形態は、本開示が包括的かつ完全となり、本発明の範囲を当業者に完全に伝えるように提供される。本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈により明らかにそうでないことが指示されていない限り、複数形の指示対象を含む。「乾燥重量%」または「乾燥重量基準」に関する言及は、乾燥原料（すなわち、水を除く全ての原料）に基づく重量を指す。

【0026】

概して、本発明は、バイオマス由来のタンパク質抽出物を精製するための方法を提供する。好ましい一実施形態において、バイオマス由来のタンパク質抽出物は、ニコチアナ種の植物由来のタンパク質を含む。多くの場合、様々なバイオマスからタンパク質を得る方法は、純粋なタンパク質ではなく、バイオマスから抽出された様々な他の成分を含有し得るタンパク質濃縮材料をもたらす。例えば、ある特定の実施形態において、バイオマスから抽出された粗タンパク質濃縮材料は、例えば、脂質、クロロフィル、タンニン、ミネラル、植物の構造成分、及びフェノール色素等の物質をさらに含み得る。

【0027】

本開示は、タバコから抽出したタンパク質に焦点を合わせるが、本方法は、タバコ以外の植物材料から抽出された粗タンパク質材料に適用でき得ることに留意されたい。したがって、本明細書に記載される方法は、青葉を含む任意の植物及び／またはタンパク質を含むと考えられている任意の植物に適用できることが意図される。いくつかの実施形態において、本方法は、木、低木、草、シダ類、つる植物、コケ類、藻類、及び香料植物に適用できる。例えば、本開示に従ってタンパク質濃縮材料を調製及び精製するための方法は、いくつかの実施形態において、例えば、ハウレンソウ、ムラサキウマゴヤシ、フダンソウ、ケール、チコリ、アマランス、大麦葉、カラシナ、クローバー、人参葉、及びビーツ葉等の植物に適用できる。

【0028】

本開示に従って、タンパク質濃縮材料は、濃縮物または単離物の形態で組成物等のより純粋なタンパク質組成物を提供するためにさらに処理され得る。「タンパク質濃縮材料」とは、植物由来であり、1種以上のタンパク質を含有する材料（例えば、抽出物）を意味する。本明細書に記載される粗タンパク質濃縮材料は、概して、望ましくない成分／不純

10

20

30

40

50

物、例えば、灰、金属塩、微量金属、アルカロイド（例えば、ニコチン）、沈殿物、及び他の残留材料の量を含む。さらに、タンパク質濃縮材料は、望ましくない官能または感覚刺激性の特性（例えば、風味特性、臭気、及び／または色）を示し得る。本明細書において使用される場合、「タンパク質濃縮物」とは、乾燥重量基準で約29重量%～約89重量%のタンパク質を含む材料を意味する。本明細書において使用される場合、「タンパク質単離物」とは、乾燥重量基準で約90重量%またはそれ以上のタンパク質を含む材料を意味する。

【0029】

有利に、本発明に従って、方法は、必要最小量のある望ましくない成分／不純物を含有する濃縮物及び／または単離物を得るために、タンパク質濃縮材料を精製するために提供される。例えば、ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮材料は、一定量の灰、金属塩、微量金属、重金属、アルカロイド、及び／または存在する他の不純物のうちの1つ以上を除去し、それにより、金属のタンパク質含有量を増加させるために処理され、より純度の高いタンパク質濃縮物またはタンパク質単離物を得る。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮材料は、例えば、臭気及び／もしくは色を取り除くことによって、ならびに／または風味特性を改変することによって、官能特性を改変するために処理される。したがって、本発明はまた、乾燥重量基準で必要最小量（例えば、約10重量%未満、約5重量%未満、約4重量%未満、約3重量%未満、約2重量%未満、約1重量%未満、約0.5重量%未満、約1重量%未満、約0.1重量%未満、約0.01重量%未満、または検出できない量）のそのような望ましくない成分／不純物を含むタンパク質組成物も提供する。

【0030】

本開示は、いくつかの実施形態において、大量生産に適用でき、大量生産という用語は、大量生産レベルにおける大量のバイオマスを処理することを指す。「バイオマス」という用語ならびに「バイオマター (biomatter)」及び「植物源」等の関連用語は、そこから対象となる成分を抽出、分離、または単離するために処理され得る収穫された植物のあらゆる部分を指すと理解される。処理は、様々な植物またはその部分、例えば、種、花、茎、幹、根、塊茎、葉、または植物のあらゆるさらなる部分に関して行われ得る。

【0031】

特定の実施形態において、本明細書に記載される方法は、特に、タバコ植物材料またはその一部から得られた粗タンパク質含有材料（例えば、抽出物）の単離及び／または精製に関連し得る。本開示に従って使用される例示的なタバコ植物材料は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Byrdらの米国特許公開第2012/0272976号に記載される、ある種のニコチアナ種の植物からなり得る。様々な種類のタバコ、栽培活動、及び収穫活動に関するさらなる説明は、参照により本明細書に組み込まれる、Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (編) (1999)に記載されている。本発明における使用に好適なニコチアナ種の種類に関する追加情報は、参照により本明細書に組み込まれる、Dubéらの米国特許出願公開第2012/0192880号に見出され得る。植物材料は、ニコチアナ種の植物の全植物または任意の部分に由来する材料を含んでよい。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Coleman, IIIらの米国特許出願公開第2011/0174323号、及びDubéらの同第2012/0192880号に記載されるタバコ植物の部分参照されたい。

【0032】

ニコチアナ種の植物は、未成熟形態または成熟形態のいずれかで用いることができ、参照により本明細書に組み込まれる、Dubéらの第2012/0192880号に記載されるように、未乾燥形態または乾燥形態のいずれかで使用され得る。タバコ材料は、冷蔵、冷凍、乾燥（例えば、凍結乾燥もしくはスプレー乾燥）、照射、黄変、加熱、調理（例えば、焙煎、揚げ、もしくは沸騰）、発酵、漂白等の様々な処理プロセスに供され得るか

、またはそうでなければ後の使用のための貯蔵もしくは処理に供される。いくつかの実施形態において、収穫タバコは、本明細書に記載されるさらなる処理前に、緑色植物が褐変するのを防止するために、緩衝液または酸化防止剤（例えば、メタ重亜硫酸ナトリウム緩衝液）が噴霧され得る。他の例示的な加工技法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Brinkleyらの米国特許出願公開第2009/0025739号、及びColeman, IIIらの同第2011/0174323号に記載されている。ニコチアナ種の植物の少なくとも一部分は、参照により本明細書に組み込まれる、2012年4月11日に出願されたMarshallらの米国特許出願第13/444, 272号、及び2012年7月19日に出願されたMoldoveanuの米国特許出願第13/553, 222号に記載されるように、収穫前または後に、酵素及び／またはプロバイオティクスで処理され得る。

10

【0033】

特定の実施形態において、処理されるべきタンパク質濃縮材料のタンパク質（ならびに本明細書に記載される結果として得られた濃縮物及び単離物を含むタンパク質）は、分画1（「F1」）タンパク質及び／または分画2（「F2」）タンパク質を含み得る。F1タンパク質及びF2タンパク質は、概して、植物バイオマスの水溶性タンパク質部分を作り上げる。F1タンパク質は、サブユニット分子量が約550kDであるリブローースー1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ-オキシゲナーゼ（一般に、RuBisCOと称される）として知られている酵素である。RuBisCOは、主として、光合成を行う全ての植物に存在する場合、世界中で最も豊富なタンパク質であると考えられる。RuBisCOは、葉の総タンパク質含有量の最大約25%、及び葉の固体物質の最大約10%を含み得る。RuBisCOは、二酸化炭素の光合成固定の初期工程に不可欠であり、リブローースー1, 5-ビスリン酸のカルボキシル化及び／または酸素化を触媒する役割を果たす。F2タンパク質は、細胞質及び葉緑体の起源の可溶性タンパク質の混合物である。F2タンパク質のタンパク質及びペプチドは、概して、約3kD～約100kDの範囲の分子量を有する。

20

【0034】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載される方法に従って処理されるタンパク質濃縮材料は、参照により本明細書に組み込まれる、2013年3月14日に出願されたMuaraの米国特許出願第13/830, 063号（この主題は、本明細書に簡潔に概説される）に記載される方法に従って調製される。米国特許出願第13/830, 063号の開示に従って、タバコ植物またはその部分からのRuBisCO濃縮抽出物及び／またはF2タンパク質濃縮抽出物を得るために実行され得るある例示的な一連の処理工程には、以下の工程が含まれ得る。タバコ材料を、均質化し、固体パルプ及び液体のタンパク質含有抽出物を得ることができる。抽出物を浄化させて、そこから固体を取り除き、固体分画及び浄化されたタンパク質含有抽出物を得ることができる。次いで、抽出物のpHを調整し、液体成分及び固体のタンパク質含有沈殿物に分離する。沈殿物は、概して、RuBisCO、及び様々な追加成分を含む。沈殿物の含有量は、前述の工程に使用されるpHに応じてある程度変動し得ることを留意されたい。例えば、pHが約4.5～約6である場合、沈殿物は、RuBisCOをより多く含み得るのに対して、pHが約4.5未満である場合、沈殿物は、有意な量のF2タンパク質をさらに含み得る。沈殿物は、濾過に供されて、タンパク質濃縮材料を得る。有意な量のF2分画が液体成分中に含まれる場合、その液体成分は、例えば、濾過によって（例えば、ある特定の残りの成分を通過させることができるが、概して、F2タンパク質を保有する、フィルターまたは膜を通して）または沈殿によって（例えば、液体成分のpHを、約4.5未満、好ましくは、約3～約4.5のような、F2タンパク質を沈殿させるのに十分なpHに調節することによって）、処理することができる。

30

40

【0035】

米国特許出願第13/830, 063号に開示される、RuBisCO-及びF2タンパク質濃縮材料、RuBisCO濃縮材料、ならびに／またはF2タンパク質濃縮材料の

50

産生のための代替の例示的なプロセスは、以下の工程を含む。タバコ材料を、均質化し、固体パルプ及び液体のタンパク質含有抽出物を得ることができる。次いで、抽出物を浄化して、そこから固体を取り除き（例えば、酸性または塩基性の浄化されたタンパク質含有抽出物を得るために、pH調節工程を介して）、固体分画及び浄化されたタンパク質含有抽出物を得ることができる。抽出物を濾過し、洗浄して、固体のRuBisCO濃縮材料及び透過物を得る。ある特定の実施形態において、透過物は、F2タンパク質を含み得、透過物を、任意に、処理して、F2タンパク質濃縮材料を得ることができる。

【0036】

当然のことながら、様々なさらなるプロセスは、これらの例示的な方法内で、または本明細書に引用される参考文献中の方法及び上述の方法の工程に加えて、使用され得ることを理解されるべきである。例えば、典型的な分離プロセスは、溶媒抽出（例えば、極性溶媒、有機溶媒、または超臨界流体を用いる）、クロマトグラフィー（例えば、分取液体クロマトグラフィー）、清澄化、蒸留、濾過（例えば、超濾過）、再結晶化、及び／または溶媒－溶媒区画等の1つ以上のプロセス工程を含み得る。いくつかの実施形態において、タバコ植物またはその部分は、例えば、ある特定の化合物を遊離し、より効率的な分離に使用可能な所望の化合物を作製するように前処理され得る。いくつかの実施形態において、複数の方法を用いて、所望の化合物を得る。

【0037】

タバコ及び他の植物からタンパク質を抽出する他の例示的な手段には、Thompsonの米国特許第7,337,782号、Gargerらの同第6,033,895号、Clappらの同第4,941,484号、Johalの同第4,588,691号及び同第4,400,471号、Kwanyuenらの同第4,347,324号、Bourqueの同第4,340,676号、DeJongの同第4,333,871号、Wildmanらの同第4,289,147号及び同第4,268,632号、Bickoffらの同第3,959,246号、同第3,823,128号、及び同第3,684,520号、Loらの米国特許出願公開第2010/0093054号、Kaleの同第2013/0072661号、2013年3月14日に出願されたMuraの米国特許出願第13/830,063号、Van de Veldeらの国際出願公開第WO2011/078671号、及びLoの同第WO2008/143914号、ならびにParkerらの欧州特許公開第EP2403888号、Boddupalliらの同第EP1691759号、及びBrinkhausらの同第EP1067946号において記載されるものが挙げられるが、これらに限定されず、これらは全てが、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。他の例示的な処理方法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Mortonらの米国特許出願公開第2012/0141648号において提供される。

【0038】

本明細書に論じられる精製プロセスにおける出発点として使用されるタンパク質濃縮材料は、様々な形態で得られ得る。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮材料は、湿潤形態で得られる。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮抽出物は、抽出物が主に固体形態を達成するように、溶媒除去プロセスに供される。タンパク質濃縮抽出物は、低溶媒形態で得られ得る。「低溶媒形態」という用語は、材料（例えば、タンパク質濃縮タバコ抽出物）の水分含有量を含む溶媒含有量が、材料の全重量基準で約12パーセント未満であることを意味する。低溶媒形態でタンパク質濃縮抽出物を得るための従来の方法には、スプレー乾燥、凍結乾燥、ベルト乾燥、気流乾燥、または他のそのような方法が挙げられる。抽出物をスプレー乾燥または凍結乾燥させる前に、液体抽出物を濃縮することが特に望ましい。代表的なスプレー乾燥プロセスは、参照により本明細書に組み込まれる、Tughanの米国特許第3,398,754号に記載されている。代表的な凍結乾燥プロセスは、参照により本明細書に組み込まれる、Greenの米国特許第3,316,919号に記載されている。低溶媒または固体形態で（例えば、粉末として）抽出材料を得るための方法及び条件は、当業者には明らかであろう。

【0039】

タンパク質濃縮材料（例えば、抽出物）は、典型的には、一部の割合の望ましくない成分及び／または特徴を含む。例えば、いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮材料は、望ましくないレベルまたは種類の臭気、風味、及び／または色を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮材料は、望ましくないレベルの灰、望ましくないレベルのアルカロイド（例えば、ニコチン）、及び／または望ましくないレベルの重金属を含む。本開示に従って、植物材料から単離された粗タンパク質含有材料（いくつかの実施形態において、RuBisCO及び／またはF2タンパク質を含み得る）は、さらに処理されて、処理前よりもさらに低濃度のこれらの望ましくない成分のうちの1つ以上を有するタンパク質組成物（例えば、濃縮物または単離物の形態で）を得る。様々な種類の処理が、

10

【0040】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質濃縮材料は、灰及び／またはアルカロイド（例えば、ニコチン）を除去するために処理される。灰は、概して、水及び有機物質がバイオマス試料から除去される場合、固体粉末状物質が残留し、これには、例えば、無機塩及び無機物が含まれ得ることを理解されたい。タンパク質濃縮材料を調製するある特定の方法は、ある程度の灰を生成し得、いくつかの実施形態において、これは、そのようにして得られたタンパク質濃縮材料中に保有され得る。例えば、いくつか

20

【0041】

灰除去処理は、いくつかの実施形態において、透析濾過プロセスを含み得る。透析濾過は、タンパク質、ペプチド、核酸、及び他の生体分子を含有する溶液から塩または溶媒を除去する、置き換える、またはその濃度を低下させるために限外濾過膜を使用する技法である。プロセスは、透過性（多孔質の）膜フィルターを利用して、それらの分子の大きさに基づいて溶液及び懸濁液の成分を分離する。限外濾過膜は、膜孔よりも大きな分子を保持するが、塩、溶媒、及び水のようなより小さな分子は、100%透過でき、自由に膜を

30

【0042】

本開示に従って、無機塩及び／またはニコチンは限外濾過膜を透過することができるが、タンパク質の分子量がはるかに大きい場合、保有物中にとどまることが見込まれる、透析濾過プロセスが、有利に選択される。特定の実施形態において、5kDaの分子量カットオフ（MWCO）のフィルター膜が低減する（例えば、タンパク質濃縮材料の無機塩（灰）及び／またはニコチン含有量を著しく低減することができる透析濾過プロセス。様々な他のMWCOフィルター膜が同様の結果をもたらし得るが、但し、標的タンパク質（複数を含む）の分子量がフィルター膜のMWCOを上回り、除去のための標的化合物（例えば、無機塩及び／またはニコチン）の分子量がフィルター膜のMWCOをはるかに下回る

40

【0043】

一般規則として、膜のMWCOは、完全な保持を確保するために保持される分子の分子量の1/3倍未満（例えば、約1/3～約1/6倍）であるべきであることを理解されたい。フィルター膜のMWCOが保持されるタンパク質の分子量に近いほど、濾過中の一部の製品損失の可能性が大きくなる。例えば、タンパク質濃縮物または単離物において提供される所望のタンパク質がRuBisCOである場合、RuBisCOの知られている分子量（490kDa）に基づいて、例えば、5kDa、10kDa、25kDa、50kDa、75kDa、100kDa、または150kDaのMWCO値を有するフィルター膜が、無機塩及び／またはニコチンの十分な除去及びタンパク質の十分な保持を提供し得

50

ることを理解されたい。そのようなプロセスは、有利に、実験室規模及びプロセス規模の両方でうまく使用され得る。

【0044】

様々な他の添加剤が含まれ得るが、透析濾過のための溶液は、概して、水である。透析濾過は、いくつかの実施形態において、pHを制御し得る。例えば、透析濾過は、いくつかの実施形態において、塩基性条件下で行われ得、したがって、塩基（例えば、NaOH）を添加して、透析濾過プロセスを行う所望のpHの溶液を確保することができる。

【0045】

透析濾過プロセスは、灰（例えば、無機塩）及び／またはニコチンの低減をもたらし得る。例えば、いくつかの実施形態において、灰含有量は、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、少なくとも約99.9%、少なくとも約99.99%、または100%低減され得る。ある特定の実施形態において、そのようにして得られたタンパク質濃縮物または単離物中の最終的な灰含有量は、有利に、乾燥重量基準で、約15重量%未満、約12重量%未満、約10重量%未満、約8重量%未満、約5重量%未満、約3重量%未満、約2重量%未満、または約1重量%未満（例えば、0重量%）である。いくつかの実施形態において、ニコチン含有量は、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、少なくとも約99.9%、または100%低減され得る。ある特定の実施形態において、そのようにして得られたタンパク質濃縮物または単離物中の最終的なニコチン含有量は、有利に、約10µg/g未満、約5µg/g未満、約1µg/g未満、約0.1µg/g未満、約0.01µg/g未満（例えば、約0µg/gまたは検出不能）である。

【0046】

さらなる実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質濃縮材料を処理して、1つ以上の重金属を除去する。重金属は、典型的には、有毒であると見なされ、比較的高い原子量、原子番号、及び密度（典型的には、5.0を超える比重を有する）を有する金属元素である。例示的な重金属には、カドミウム、銅、鉛、水銀、ニッケル等が含まれる。様々な樹脂は、ある特定の実施形態において、本開示に従ってタンパク質濃縮材料からのそのような金属の除去に使用される。例えば、いくつかの実施形態において、選択イオン交換樹脂（例えば、強酸性または弱酸性陽イオン樹脂）、キレート樹脂、または活性炭が使用され得る。そのような樹脂は、様々なキレート基（例えば、イミノ二酢酸塩、イミダゾール、トリアミンテトラ酢酸、及び／またはトリアミンテトラ酢酸塩）を含み得る。

【0047】

広範な樹脂が、試料からの重金属の除去のために市販されており、本開示に従って使用され得る。代表的な樹脂には、Lennotech Water Treatment and Air Purification (Rotterdamseweg, The Netherlands) からの Lewatit (登録商標) TP樹脂; Purolite (Bala Cynwyd, PA) からの Purolite (登録商標) 樹脂; The Dow Chemical Company (Midland, Michigan) からの Dowex (商標) MAC-3、Marathon (商標)、21KまたはM-43樹脂; ITOCHU Chemicals America Inc. (White Plains NY) からの CR20樹脂または PK228L樹脂; Silicycle (Quebec, Canada) からの SiliaMet S (登録商標) イミダゾール樹脂、SiliaMet S (登録商標) TAAcOH樹脂、または SiliaMet S (登録商標) TAAcONa樹脂、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

実際には、タンパク質濃縮材料は、様々な方法において、重金属の除去のための樹脂で処理され得る。例えば、タンパク質濃縮材料は、例えば、水中に溶解され、適切な樹脂で充填されたカラム／カートリッジに通過され得る。他の実施形態において、タンパク質濃縮

材料は、例えば、水中に溶解することができ、適切な樹脂（バルク形態で）を溶液に添加することができる。そのような実施形態において、溶液中のタンパク質と樹脂との接触を強化するために、樹脂含有混合物は、任意に、かき混ぜ及び／または振とうされ得る。

【0049】

タンパク質濃縮抽出物を溶解する溶媒は、タンパク質を溶解するのに十分な任意の溶媒であり得る。ある特定の実施形態において、溶媒は、水であるが、様々な他の溶媒が独立して、または水と組み合わせて使用され得る。溶液のpHを、例えば、酸、塩基、または緩衝液の添加によって制御するのが好ましくあり得る。いくつかの実施形態において、選択された樹脂の組成物は、ある特定の使用可能なpH範囲に影響を及ぼし得、それに応じて溶液は調節されるべきである。

10

【0050】

ある特定の実施形態において、（例えば、カラム／カートリッジを加熱することによってまたは樹脂混合物を加熱することによって）樹脂及び／またはタンパク質溶液を加熱することが有益であり得る。材料を加熱する温度は、変動し得、いくつかの実施形態において、選択された特定の樹脂の特性に応じて異なり得る。ある特定の実施形態において、樹脂は、ほぼ室温～約100℃、またはほぼ室温～約80℃（例えば、約50℃～約70℃、例えば、約60℃）で加熱され得る。

【0051】

タンパク質濃縮材料が樹脂と接触する時間もまた、変動し得る。例えば、いくつかの実施形態において、1時間以下が、望ましくない金属の十分な除去を行うのに十分であり得る。他の実施形態において、より長時間（例えば、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約5時間、または少なくとも約6時間、例えば、約0.5～10時間、約1～約8時間、または約2～約7時間）樹脂と接触させることが、タンパク質濃縮材料には有益であり得る。

20

【0052】

ある特定の実施形態において、金属含有量における有意な低減は、加熱及び／またはかき混ぜと組み合わせて、Silicyl樹脂TAAcOH（トリアミンテトラ酢酸基で官能化されたシリカゲル樹脂）及びTAAcONa（トリアミンテトラアセテートナトリウム塩で官能化されたシリカゲル樹脂）の組み合わせを使用して達成され得る。具体的には、この処理は、ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮材料の銅、カドミウム、鉛、及びニッケル（単独に）の含有量を少なくとも約50%低減し得る。

30

【0053】

樹脂による処理後の重金属含有量の全体的な低減は、変動し得る。有利に、ある特定の実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質濃縮材料の処理は、銅、カドミウム、鉛、及びニッケルを含む金属の低減を提供し得る。例えば、いくつかの実施形態において、樹脂処理は、樹脂処理前の未処理試料と比較して、銅、カドミウム、鉛、及びニッケルのそれぞれの少なくとも約25%、少なくとも約50%、または少なくとも約75%の低減を提供し得る。

【0054】

ある特定の実施形態において、本発明によって提供されるタンパク質濃縮物または単離物における全重金属濃度は、有利に、約60μg/g未満、約50μg/g未満、約40μg/g未満、約30μg/g未満、約20μg/g未満、または約10μg/g未満である。ある特定の実施形態において、本発明によって提供されるタンパク質濃縮物または単離物におけるカドミウム、銅、鉛、及びニッケルの合わせた濃度は、約40μg/g未満、約35μg/g未満、約30μg/g未満、約25μg/g未満、約20μg/g未満、約15μg/g未満、約10μg/g未満、または約5μg/g未満であり得る。

40

【0055】

いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮材料は、超臨界抽出によって処理される。本明細書において使用される場合、「超臨界」という用語は、温度及び圧力に関して溶媒の臨界点以上であることを意味する。超臨界抽出は、抽出溶媒として超臨界溶媒を用い

50

て、抽出剤を母材から分離するプロセスである。超臨界抽出法は、概して、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Clappらの米国特許第5,435,325号、及びIrwinらの同第7,638,155号において教示されている。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮抽出物は、（例えば、水を用いて）湿らせることによって超臨界抽出前に処理される。例えば、ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮抽出物は、約5重量%～約50重量%の水分（例えば、約10重量%～約50重量%の水分）を有する、湿潤形態で提供される。

【0056】

超臨界抽出に使用される溶媒は、変動し得、タンパク質濃縮抽出物から成分を超臨界抽出するのに適している任意の溶媒である。特に、溶媒は、超臨界状態で得られ、タンパク質濃縮抽出物の成分の少なくとも一部を抽出し、最終的に、さらに精製抽出したタンパク質単離物を得ることが可能である。溶媒の例には、二酸化炭素、n-プロパン、n-ペンタン、n-ヘプタン、シクロヘキサン、n-ヘキサノール、エタノール、n-ペンタノール、トルエン、アセトン、酢酸メチル、ジエチルエーテル、石油エーテル、ハロゲン化炭化水素、例えば、ジクロロメタン及びジフルオロエタン等、ならびにこれらの混合物が挙げられる。

【0057】

超臨界抽出溶媒は、任意に、いくつかの実施形態において、超臨界溶媒中の所望の抽出標的の溶解性を高めるのに役立ち得る所定量の改質剤（例えば、添加溶剤）と共に使用され得る。例示的な添加溶剤には、炭化水素、例えば、エタン、エチレン、プロパン、プロピレン等が挙げられる。そのような添加溶剤は、超臨界抽出工程のための超臨界溶媒と混合することができるか、そのような添加溶剤は、超臨界抽出前にタンパク質濃縮タバコ抽出物と混合することができる。様々な他の改質剤（例えば、共溶媒）を添加して、抽出物を改質することができる。例えば、ある特定の実施形態において、有機共溶媒を、超臨界抽出溶媒に添加する。有機溶媒は、例えば、エタノール、1-ブタノール、イソプロパノール、メタノール、1-プロパノール、及びこれらの混合物であり得る。超臨界抽出溶媒に添加される添加溶剤または他の改質剤の量は、変動し得、例えば、約0容量%～約50容量%（例えば、約10容量%～約30容量%）であり得る。

【0058】

超臨界溶媒と接触するタンパク質濃縮抽出物の量は、変動し得る。典型的には、水性抽出タバコ成分に対する溶媒の重量は、タンパク質濃縮タバコ抽出物の有意な量の超臨界抽出した成分の十分な抽出を得るのに十分である。タンパク質濃縮抽出物に対する溶媒の量は、要因、例えば、溶媒の種類、超臨界抽出が行われる温度及び圧力、加工されるタバコの種類、タンパク質濃縮タバコ抽出物及び超臨界溶媒の接触が行われる様式、及び他のかかる要因に応じて異なる。

【0059】

超臨界抽出が行われる条件は、異なり得る。典型的な温度は、特定の溶媒の臨界温度を超える。例えば、特定の実施形態において、超臨界抽出温度は、最大約70℃（例えば、約0℃～約70℃）である。例えば、超臨界抽出溶媒がCO₂を含む場合、抽出は、概して、約30℃～約70℃（例えば、約30℃または約60℃）で行われる。また、超臨界抽出の圧力も変動し得る。例示的な圧力範囲は、約0mPa～約35mPa（例えば、約10mPa、約20mPa、または約30mPa）である。抽出が生じる速度を増加させるために、溶媒／タバコ混合物を、攪拌するまたはそうでなければ操作する（例えば、かき混ぜる）ことができる。例えば、タンパク質濃縮抽出物内またはタンパク質濃縮抽出物内での超臨界溶媒の良好な伝播をもたらすために、条件が提供され得る。有利に、望ましくないタンパク質の変性を避けるために、条件が選択される。

【0060】

超臨界抽出後、結果として得られた抽出材料を乾燥させて（例えば、空気乾燥によって）、より精製したタンパク質組成物を得ることができる。タンパク質組成物は、いくつかの実施形態において、超臨界抽出前のタンパク質濃縮抽出物よりも高い含有量のタンパク

10

20

30

40

50

質を含むことができる。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書に記載される超臨界抽出は、少なくとも約5重量%、10重量%、15重量%、20重量%、または25重量%のタンパク質含有量の増加を提供し得る。したがって、超臨界抽出後のタンパク質組成物は、概して、少なくとも約50乾燥重量%、少なくとも約60乾燥重量%、少なくとも約70乾燥重量%、少なくとも約80乾燥重量%、少なくとも約90乾燥重量%、少なくとも約95乾燥重量%、少なくとも約98乾燥重量%、または少なくとも約99乾燥重量%のタンパク質（例えば、RuBisCO及び／またはF2タンパク質）を含む。

【0061】

有利に、ある特定の実施形態において、そのようにして得られたタンパク質組成物は、タンパク質濃縮抽出物と比較して、低減したニコチン含有量を示し得る。例えば、ある特定の実施形態において、超臨界抽出は、タンパク質濃縮抽出物（超臨界抽出前の）と比較して、ニコチン含有量を少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%低減し得る。例えば、いくつかの実施形態において、超臨界抽出は、タンパク質濃縮抽出物（超臨界抽出前の）と比較して、ニコチン含有量を約5%～約100%、例えば、約20%～約100%、または約50%～約100%）低減し得る。

【0062】

いくつかの実施形態において、超臨界抽出は、抽出に供したタンパク質濃縮抽出物の様々な他の特徴を予想外に変化させる。例えば、いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮抽出物は、妙な味（例えば、塩味またはそうでなければ負の味）を示し得、これは超臨界抽出プロセスによって著しく低減され得るか、または弱められ得る。同様に、いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮抽出物は、異臭（例えば、土の匂い）を示し得、これは超臨界抽出プロセスによって著しく低減または除去され得る。さらに、タンパク質濃縮抽出物は、超臨界抽出プロセスによって著しく低減または除去され得る色（例えば、黄色っぽい、茶色っぽい）を示し得る。未処理抽出物を上回る超臨界抽出濃縮物または単離物の臭気、風味、及び／または色の改善は、あらゆる知られている方法によって定量化され得る。例えば、光学法（例えば、光吸収）を使用して、色の変化を評価することができるのに対して、官能パネルを使用して、臭気及びまたは風味の変化を評価することができる。したがって、ある特定の実施形態において、本明細書に記載される方法に従って、無味、無色、及び／または無臭のタンパク質濃縮物または単離物が提供される。

【0063】

本開示の方法に従って得られた本発明に従って提供されるタンパク質組成物の形態（例えば、RuBisCO濃縮物もしくは単離物、合わせたRuBisCO/F2タンパク質濃縮物もしくは単離物、及び／またはF2濃縮物もしくは単離物）は、異なり得る。典型的には、これらの材料は、固体、液体、または半固体もしくはゲル形態である。結果として得られた製剤は、凝集、絶対、または純粋な形態で使用され得る。本明細書に記載される濃縮物または単離物の固体形態は、スプレー乾燥及び凍結乾燥の形態を含み得る。本明細書に記載される濃縮物または単離物の液体形態は、水性または有機溶媒担体内に含まれる製剤を含み得る。

【0064】

本明細書に開示される方法は、いくつかの実施形態において、少なくとも約50乾燥重量%、少なくとも約60乾燥重量%、少なくとも約70乾燥重量%、少なくとも約80乾燥重量%、または少なくとも約90乾燥重量%のタンパク質を含むタンパク質濃縮物または単離物を提供し得る。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、RuBisCO及びF2タンパク質の混合物を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物中のタンパク質は、主に、RuBisCOを含む。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物中のタンパク質は、主に、F2タンパク質を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、少なくとも約50重

量%、少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、または少なくとも約90重量%のF1タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、本開示は、具体的には、ニコチアナ種の植物またはその一部から抽出されたRuBisCOの単離及び／または精製のための方法を提供する。したがって、本明細書に開示される方法は、いくつかの実施形態において、RuBisCO濃縮物または単離物、例えば、少なくとも約50乾燥重量%、少なくとも約60乾燥重量%、少なくとも約70乾燥重量%、少なくとも約80乾燥重量%、または少なくとも約90乾燥重量%のRuBisCOを含む材料を提供し得る。

【0066】

いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、少なくとも約50乾燥重量%、少なくとも約60乾燥重量%、少なくとも約70乾燥重量%、少なくとも約80乾燥重量%、または少なくとも約90乾燥重量%のF2タンパク質を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質濃縮物または単離物は、1つ以上の処理工程後、直接使用され得るが、例えば、材料を低温殺菌するか、またはそうでなければ材料を化学的に改変するために、材料を熱処理することが望ましい場合がある。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Chenらの米国特許公開第2010/0300463号を参照されたい。いくつかの実施形態において、任意の熱処理に加えてまたはその代わりに、タバコ材料は、照射され得る（例えば、タンパク質濃縮物または単離物に付随する微生物がないことを確実にするために）。

【0068】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法は、他の種類の処理プロセスと組み合わせて使用することができ、例えば、濃縮物または単離物をさらに精製または改変させ得る。例えば、いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮組成物を、例えば、全てが参照により本明細書に組み込まれる、Bhattacharyyaらの米国特許公開第2007/0186940号、Reesらの同第2011/0041859号、及びJonssonらの同第2011/0159160号、ならびに2011年5月19日に出願されたByrdらの米国特許出願第13/111,330号に記載されるインプリントポリマーまたは非インプリントポリマーと接触させる。分子インプリントまたは非インプリントポリマーによる処理を使用して、タンパク質濃縮組成物のある特定の成分を除去することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるタンパク質濃縮組成物は、かかる材料に含まれる化合物が化学変換及び／または変性するような条件に供され得る。例示的な化学変換技法は、参照により本明細書に組み込まれる、Coleman, IIIらの米国特許出願公開第2011/0174323号及びColeman, IIIらの同第2011/0259353号に記載されている。

【0069】

本明細書に記載される任意の1つ以上の精製処理プロセス後に提供されるタンパク質濃縮物及び単離物（すなわち、RuBisCO濃縮物及び単離物、合わせたRuBisCO/F2タンパク質濃縮物及び単離物、ならびに／またはF2タンパク質濃縮物及び単離物）は、有利に、様々な適用において使用され得る。多くの適用（例えば、食物製品、飼料製品、及び工業製品）のために、ある特定の動物タンパク質を植物タンパク質に置き換えることが望ましい場合がある。さらに、いくつかの適用において、一般的に使用されるある特定の他の植物タンパク質（例えば、大豆タンパク質及び／または遺伝子組み換えタンパク質）を置き換えることが望ましい場合がある。本明細書に記載される方法によって提供されるもの等のタンパク質濃縮物及び単離物は、良好な栄養特性を示し得、いくつかの実施形態において、様々な望ましくない成分（例えば、灰、金属塩、アルカロイド（例えば、ニコチン）、重金属、及び他の不純物／混入物質）の低減した含有量及び／または改変した官能特性（例えば、臭気、風味、及び／または色）を有する形態で提供され得、それらを様々な製品で用いるのに特に適しているようにする。さらに、RuBisCOのある特定の物理的特性は、卓越した結合、ゲル化、溶解度、及び乳化挙動を有するため、そ

10

20

30

40

50

のような製品で用いるのに有利なものにする。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される種類の処理は、食品等級タンパク質含有材料を提供し得る。ある特定の実施形態において、タンパク質濃縮単離物は、栄養価において大豆タンパク質を上回るタンパク質材料を含む。いくつかの実施形態において、タンパク質濃縮物または単離物は、医薬目的に有用であり得る。

【0070】

本発明に従って提供される加工材料は、多種多様の商業的応用に有用な含有物である。材料は、多種多様の工業的製剤において、結合剤、充填剤、または増量剤として使用され得るか、あるいは他の機能の役割を果たし得る、または機能的属性を与え得る。例えば、材料は、工業への応用を有する様々な種類の樹脂の成分として使用し得、さらに、コーティング（例えば、インク及び塗料用）ならびに接着剤（例えば、のり及び熱溶解製剤用）の成分として使用され得る。材料は、多種多様の化粧品製剤の成分として使用され得る（例えば、材料は、シャンプー及びスキンケア製品内に組み込まれ得る）。材料は、食品、栄養補助食品、及び機能性食品の成分として（例えば、飲料、加工食品製品等の成分として）使用され得る。材料はまた、動物の飼料の成分に使用され得る。材料は、薬学的製剤の成分として（例えば、医薬目的のために使用される液体、ガム、トローチ剤、錠剤、及び丸薬の成分として）使用され得る。さらに、材料は、タバコ製品の成分、例えば、タバコ燃焼製品（例えば、紙巻タバコ、葉巻、パイプタバコ等）、喫煙物品を加熱させるタバコ（例えば、R. J. Reynolds Tobacco CompanyによってEclipseのブランド名で売られているもの等の紙巻タバコ）、無煙タバコ製品（例えば、湿性嗅ぎタバコ、噛みタバコ、スヌース及びいわゆる溶解性タバコ製品）、いわゆる電子タバコ等の成分として使用され得る。

【0071】

タバコ燃焼製品での使用に関しては、本明細書に記載される濃縮物及び単離物が様々な性質において使用され得る。例えば、ある特定の実施形態において、濃縮物及び単離物は、ケーシング材料と混合され得、ケーシング原料として、またはトップドレッシングとしてタバコに適用され得、紙巻タバコの製造プロセス中、紙巻タバコのフィルターに（例えば、フィルタープラグ、プラグラップ、もしくはチップング紙に）組み込まれ得るか、または紙巻タバコ包装紙の、好ましくは内面に組み込まれ得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Dubeらの米国特許公開第2012/0192880号に記載される喫煙物品において使用されるタバコ単離物に関連する説明及び参照文献を参照されたい。代表的なタバコブレンド、非タバコ成分、及びそこから製造される代表的な紙巻タバコも、上記のDubeらの参照文献に記載されている。

【0072】

図1を参照すると、紙巻タバコの形態であり、本発明のタンパク質組成物を含有することができる喫煙物品のある特定の代表的な成分を有する喫煙物品10が示される。紙巻タバコ10は、外接する包装材料16に含有される喫煙可能なフィラー材料（例えば、約0.3〜約1.0gのタバコ材料等の喫煙可能なフィラー材料）の装入物またはロールの略円筒状ロッド12を含む。ロッド12は、従来「タバコロッド」と称される。タバコロッド12の末端は、喫煙可能なフィラー材料を露出するように開いている。紙巻タバコ10は、包装材料16に適用される1つの任意の帯22（例えば、デンプン、エチルセルロース、またはアルギン酸ナトリウム等のフィルム形成剤を含むプリントコーティング）を有するとして示され、その帯は、紙巻タバコの長手方向軸に対して垂直方向に紙巻タバコに外接している。この帯22は、包装材料の内面（例えば、喫煙可能なフィラー材料に面する）またはあまり好ましくないが、包装材料の外面にプリントされ得る。

【0073】

タバコロッド12の一端には、点火端18があり、口端20には、フィルター要素26が位置付けられる。フィルター要素26は、フィルター要素及びタバコロッドが末端間関係で軸方向に整列し、好ましくは互いに隣接するように、タバコロッド12の一端に隣接して位置付けられる。フィルター要素26は、略円筒形状を有してよく、その直径は、タ

バコロッドの直径に本質的に等しい場合がある。フィルター要素26の末端は、そこを通る空気及び煙の通過を許す。

【0074】

通気または空気希釈された喫煙物品は、それぞれがチップング材料及びプラグラップを通じて伸長する、一連の穿孔30等の任意の空気希釈手段とともに提供され得る。任意の穿孔30は、レーザー穿孔技法等の当業者に知られている様々な技法によって作製され得る。代替として、いわゆるオフライン空気希釈技法を（例えば、多孔質紙プラグラップ及び事前に穿孔されたチップング紙の使用を通じて）使用することができる。本発明のタンパク質組成物は、タバコ装入物の成分として、包装紙の成分として（例えば、紙に含まれるか、または紙の内部もしくは外部にコーティングされる）、接着剤として、フィルター要素成分として、挙げられるが、これらに限定されない、喫煙物品の成分のうちのいずれかに、及び／または喫煙物品の任意の領域に位置するカプセル内に組み込むことができる。

10

【0075】

いわゆる「電子タバコ」を含む、使用時に燃焼されることを意図しないニコチン及び／またはタバコ材料（またはそのいくつかの部分もしくは成分）を含有するエアロゾル生成デバイスにおいて本開示のタンパク質組成物の使用に関して、例示的な詳細が、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Dubeらの米国特許公開第2012/0192880号において提供される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Robinsonらの米国特許第7,726,320号において記載される背景技術、2012年3月28日に出願されたGriffith, Jr. らの米国特許出願第13/432,406号、2012年6月28日に出願されたSebastianらの米国特許出願第13/536,438号、2012年9月4日に出願されたCollettらの米国特許出願第13/602,871号、2012年10月8日に出願されたSearsらの米国特許出願第13/647,000号、及び2013年3月15日に出願されたNovak, III らの米国特許出願第13/840,264号において記載されている、様々な代替の喫煙物品、エアロゾル送達デバイス、及び熱生成源を参照されたい。

20

【0076】

無煙タバコ製品において本開示の濃縮物及び単離物の使用に関して、例示的な製品には、粉末湿性嗅ぎタバコ（例えば、スヌース）；粉末乾燥嗅ぎタバコ；噛みタバコ；ペレットタバコ小片；押出もしくは形成されたタバコストリップ、小片、ロッド、円筒、もしくはスティック；微細化碎粉；粉末小片及び成分の細かく分割もしくは粉碎された凝集体；フレーク状小片；成形タバコ小片；ガム；テープ状フィルムのロール；易水溶性もしくは水分散性フィルムもしくはストリップ；溶融性組成物；糖衣錠；トローチ；または外殻及び内部領域を有するカプセル状材料等の無煙タバコ製品が挙げられる。様々な種類の無煙タバコ製品は、参照により本明細書に組み込まれる、Dubeらの米国特許公開第2012/0152265号において説明または参照されている。さらなる含有物は、本発明に従って無煙タバコ組成物と混和され得るか、またはそうでなければそれに組み込まれ得る。例示的なカプセル型添加剤は、例えば、参照により本明細書にこれまでに組み込まれている、Atchleyの第WO2010/132444号において記載されている。また、参照により本明細書に組み込まれる、Huntらの米国特許公開第2012/0055494号、及びByrdらの同第2012/0199145号に記載されている、無煙タバコ含有物も参照されたい。

30

40

【0077】

図2を参照すると、本発明の濃縮物及び単離物を含む代表的なスヌース型のタバコ製品が示される。特に、図4は、無煙タバコ組成物44を含有する水透過性外部パウチ42を有する無煙タバコ製品40を示す。このタバコ製品の成分のうちのいずれかは、本明細書に記載されるタバコ由来のタンパク質材料を含み得る（例えば、パウチ裏地の内部もしくは外部、またはそこに含有される無煙タバコ組成物の一部分）。

【0078】

50

タバコ組成物またはタバコ製品に組み込まれる本発明のタンパク質濃縮物または単離物の量は、濃縮物または単離物の所望の機能、濃縮物または単離物の化学的構成、及び濃縮物または単離物が添加されるタバコ組成物の種類に応じて異なり得る。タバコ組成物に添加される濃縮物または単離物の量は異なり得るが、典型的に、濃縮物または単離物が添加されるタバコ組成物の総乾燥重量に基づいて、約50重量%を超えない。例えば、タバコ組成物に添加される濃縮物または単離物の量は、タバコ組成物の総乾燥重量に基づいて、約0.25重量%～約25重量%、または約1重量%～約10重量%の範囲内であり得る。

【0079】

そのようなタンパク質濃縮物及び単離物は、概して、タバコ組成物の文脈において記載されているが、そのような製剤は、多くの他の種類の組成物、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、2013年3月14日に出願されたM u aらの米国特許出願第13/830,063号に記載される栄養補助食品において適用可能であり得ることに留意されたい。

【0080】

実験

本発明の態様は、以下の実施例によってより完全に説明され、本発明のある特定の態様を説明するように記載されるが、その限定として見なされるものではない。

【0081】

実施例1—酸性浄化及び沈殿によるR u B i s C O濃縮抽出物の例示的な供給

タバコ植物を収穫し、葉を茎から剥がし取り、粉碎機に水を添加することによってその中で葉を均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリュウ圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、8.6のpHを有する青汁である。まず、このタンパク質含有抽出物をデカンターに通過させることによって浄化させる。塩酸を用いて、タンパク質含有抽出物のpHを5.9に調節する。珪藻土を、任意にこの抽出物に添加し、混合物を15分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに通過させる。

【0082】

結果として得られた浄化したタンパク質含有抽出物をクエン酸及び塩酸で処理し、pHを4.92に調節する。pHを調節した抽出物を47時間静置する。混合物の上部からの液体をデカントし、混合物の底部に安定した固体を得、接線流濾過を用いて1.4μmのセラミックフィルター上で加工する。そこからの残余物を濃縮して、タンパク質濃縮タバコ由来材料を得る。そのようにして得られた材料は、約85重量%～約99重量%のタンパク質を含む。

【0083】

実施例2—酸性浄化によるR u B i s C O濃縮抽出物の例示的な供給

タバコ植物を収穫し、葉を茎から剥がし取り、粉碎機に水を添加することによってその中で葉を均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリュウ圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、8.4のpHを有する青汁である。まず、このタンパク質含有抽出物をデカンターに通過させることによって浄化させる。塩酸を用いて、タンパク質含有抽出物のpHを5.9に調節する。珪藻土を、任意にこの抽出物に添加し、混合物を15分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに通過させる。濾液を水で洗浄し、pHを5.9に調節して、タンパク質の回収を増加させる。

【0084】

接線流濾過を用いて、結果として得られた浄化したタンパク質含有抽出物を500kDaの逆浸透フィルター上で加工する。残余物をグリシン溶液(pH10.5で75mMのグリシン)で洗浄し、R u B i s C O濃縮タバコ由来材料の残余物(約75～85重量%のタンパク質を含む)を得る。透過物を8℃に冷却し、接線流濾過を用いて1kDaの逆浸透フィルター上で加工する。1kDaの残余物をグリシン溶液で洗浄し、濃縮して、F2タンパク質濃縮タバコ由来材料(約30～40%のF2タンパク質を含むが、代替の濾

過方法、例えば、1 k D a のフィルターの代わりに1 0 k D a 及び／または2 0 k D a のフィルターを用いて、より高い割合、例えば、6 5 % が得られる) を得る。

【0 0 8 5】

実施例 3－酸性浄化及び沈殿による R u B i s C O 濃縮抽出物の例示的な供給

タバコ植物を収穫し、葉を茎から剥がし取り、粉碎機に水を添加することによってその中で葉を均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリー圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、8 . 7 の p H を有する青汁である。まず、このタンパク質含有抽出物をデカンターに通過させることによって浄化させる。塩酸を用いて、タンパク質含有抽出物の p H を 5 . 9 に調節する。珪藻土をこの抽出物に添加し、混合物を 1 5 分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに通過させる。

10

【0 0 8 6】

結果として得られた浄化したタンパク質含有抽出物を塩酸で処理し、p H を 4 . 9 8 に調節する。p H を調節した抽出物を 6 0 時間静置する。混合物の上部からの液体をデカントし、混合物の底部に安定した固体を得、接線流濾過を用いて 1 . 4 μ m のセラミックフィルター上で加工する。そこからの残余物を濃縮して、タンパク質濃縮タバコ由来材料を得る。そのようにして得られた材料は、約 8 5 重量%～約 9 9 重量% のタンパク質を含む。

【0 0 8 7】

実施例 4－塩基浄化による R u B i s C O 濃縮抽出物及び F 2 濃縮抽出物の例示的な供給

タバコ植物を収穫し、葉を茎から剥がし取り、粉碎機に水を添加することによってその中で葉を均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリー圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、8 . 5 の p H を有する青汁である。まず、このタンパク質含有抽出物をデカンターに通過させることによって浄化させる。水酸化ナトリウムを用いて、タンパク質含有抽出物の p H を 1 0 . 5 に調節する。活性炭を添加し、珪藻土をこの抽出物に添加し、混合物を 1 5 分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに接触させる。混合物をフィルタープレスに通過させなかった場合、塩酸を用いて、混合物の p H を 5 . 9 に調節し、次いで、フィルタープレスに通過させる。

20

【0 0 8 8】

接線流濾過を用いて、結果として得られた浄化したタンパク質含有透過物を 5 0 0 k D a の逆浸透フィルター上で加工する。残余物をグリシン溶液 (p H 1 0 . 5 で 7 5 m M のグリシン) で洗浄し、R u B i s C O タンパク質含有残余物 (約 7 5 ～ 8 5 重量% のタンパク質を含む) を得、保存する。透過物を 8 $^{\circ}$ C に冷却し、接線流濾過を用いて 1 k D a の逆浸透フィルター上で加工する。残余物をグリシン溶液で洗浄し、濃縮して、F 2 分画タンパク質濃縮タバコ由来材料 (約 3 0 ～ 4 0 % の F 2 タンパク質を含むが、代替の濾過方法、例えば、1 k D a のフィルターの代わりに 1 0 k D a 及び／または 2 0 k D a のフィルターを用いて、より高い割合、例えば、6 5 % が得られる) を得る。

30

【0 0 8 9】

実施例 5－酸性浄化及び沈殿による R u B i s C O 濃縮抽出物及び F 2 濃縮抽出物の例示的な供給

タバコ植物を収穫し、葉を茎から剥がし取り、粉碎機に水を添加することによってその中で葉を均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリー圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、8 . 4 の p H を有する青汁である。まず、このタンパク質含有抽出物をデカンターに通過させることによって浄化させる。塩酸を用いて、タンパク質含有抽出物の p H を 5 . 9 に調節する。活性炭を添加し、珪藻土をこの抽出物に添加し、混合物を 1 5 分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに通過させる。接線流濾過を用いて、結果として得られた浄化したタンパク質含有透過物を 5 0 0 k D a の逆浸透フィルター上で加工する。残余物をグリシン溶液 (p H 1 0 . 5 で 7 5 m M のグリシン) で洗浄し、R u B i s C O タンパク質含有残余物 (約 7 5 ～ 8 5 重量% のタンパク質を含む) を得、これを保存する。透過物を 8 $^{\circ}$ C に冷却し、接線流濾過を用いて 1 k D a の逆浸透フィルター上で加工する。残余物をグリシン溶液で洗浄し、濃縮し

40

50

て、F 2 分画タンパク質濃縮タバコ由来材料（約 30～40%のF 2 タンパク質を含むが、代替の濾過方法、例えば、1 kDa のフィルターの代わりに 10 kDa 及び／または 20 kDa のフィルターを用いて、より高い割合、例えば、65%が得られる）を得る。

【0090】

実施例 6—RuBiSCO 濃縮抽出物及び F 2 濃縮抽出物の例示的な供給及び分離

タバコ植物を収穫し、切り取り、粉碎機に水を添加することによってその中で均質化し、次いで、液体抽出のために、この材料を水平スクリー圧搾機に通す。そのようにして得られた液体タンパク質含有抽出物は、5.6 の pH を有する青汁である。水酸化ナトリウムを用いて、タンパク質含有抽出物の pH を 7.10 に調節する。珪藻土をこの抽出物に添加し、混合物を 15 分間かき混ぜ、次いで、フィルタープレスに通過させる。接線流濾過を用いて、結果として得られた浄化したタンパク質含有透過物を 1 kDa のフィルター上で加工する。残余物は、RuBiSCO 及び F 2 タンパク質の混合物を含み、約 50%のタンパク質を含む。

10

【0091】

実施例 7—透析濾過（実験室規模）

例えば、上の実施例 1～6 のいずれかに従って調製されたタンパク質濃縮抽出物の試料を、水中に溶解し、水酸化ナトリウムを添加することによって、この溶液の pH を 9.5 に調節する。追加の水を用いて、この溶液を、Koch Membrane Systems (KMS) の Romicon Hollow Fiber 5 kDa の MWC O フィルターが装備された KMS の Demofilter Unit に導入する。約 20 分間隔で均一な水の添加によるシステム上でこの溶液を濾過し、一定容積の残余物を確保する。NaOH の周期的な添加により、残余物の pH を約 9.5～10 で保持し、水を添加した後、pH を測定する。タンパク質溶解性を維持し、遊離塩基ニコチン透過性を確保し、タンパク質から無機塩を解離するために、この pH を選択した。色について、また、pH についても透過物を定性的にモニタリングした。まず、透過物は黄色であり、透析濾過実験の終了に近づくとき、透明になった。残余物を、7～8 の最終 pH で 10%溶解した固体になるまで濃縮し、凍結乾燥させた。

20

【0092】

透析濾過プロセスにより、元の 50 g の出発材料から 37 g の凍結乾燥した生成物の回収、または 74%の回収及び 26%の質量損失を得た。タンパク質濃縮抽出物は、18.7%の灰及び 2830 µg/g のニコチンを含有し、8.5 の pH を有した。透析濾過プロセス後、生成物は、9%の灰及び 1.0 µg/g 未満のニコチンを含有し、7.5 の最終 pH を有した。生成物中の最終タンパク質濃度は、（透析濾過前のタンパク質濃縮材料中の 78%のタンパク質濃度と比較して）乾燥重量基準で 90%であった。

30

【0093】

実施例 8—透析濾過（プロセス規模）

例えば、上の実施例 1～6 のいずれかに従って調製されたタンパク質濃縮抽出物の試料を、水中に溶解し、(4) 3.8"×40" Snyder 5 kDa の渦巻型限外濾過膜が装備された Filtration Engineering Model 93 RO/UF ユニットの容器に加える。このユニットを再循環モードに切り替え、NaOH を添加し、pH を 9.5 にし、タンパク質の可溶化を確保する。透過弁を開口し、透過物と同じ流量で水を容器に加える。透析濾過に使用される水の量は、実験室規模の透析濾過（例えば、実施例 7）に基づき得る。透過物の流量は、毎分 2 ガルであり、全透析濾過時間は、330 分間（5.5 時間）である。30 分毎に pH をモニタリングし、NaOH を用いて、9.5 に調節する。4.5 時間の時点で、さらなる pH の調節を行わず、5.5 時間後、給水を中止し、残余物を 10%の溶解した固体になるまで濃縮する。残余物の最終 pH は、7.8 であった。残余物を回収し、4℃で保存し、スプレー乾燥させた。

40

【0094】

透析濾過プロセスにより、処理の様々な困難のため、約 5 ポンドのスプレー乾燥させた生成物の回収を得るが、これは容易に対処し得る。実験室規模プロセス（実施例 7）の結

50

果に基づいて、20ポンドの出発材料から推定14.8ポンドの生成物が生じると推測され得る。元のタンパク質濃縮抽出物は、18.7%の灰及び2830 µg/gのニコチンを含有し、8.5のpHを有した。透析濾過プロセス後、生成物は、5.5%の灰及び1.0 µg/g未満のニコチンを含有し、8.1の最終pHを有した。生成物中の最終タンパク質濃度は、(透析濾過前のタンパク質濃縮材料中の78%のタンパク質濃度と比較して)乾燥重量基準で93%であった。

【0095】

実施例9—重金属の除去

透析濾過後(例えば、実施例7または8等の場合)、そのようにして得られたタンパク質単離物を、樹脂(以下により詳細に説明する)で処理する。タンパク質濃縮物を樹脂及び水と混合し、結果として得られた混合物を1時間振とうする。1時間後、この混合物を遠心分離する。上清を分離し、金属について試験する。

【0096】

a) ITOCHU CR20樹脂

【0097】

第1の樹脂は、ポリアミン官能性を有するキレート樹脂(ITOCHU Chemicals America Inc. (White Plains NY)からのCR20樹脂)である。この樹脂による処理により、カドミウム、銅、鉛、またはニッケルの全含有量の変化はなかった。

【0098】

b) ITOCHU PK228L樹脂

【0099】

第2の試験樹脂は、スルホン酸基を有する多孔性スチレンDVBポリマーマトリクス(ITOCHU Chemicals America Inc. (White Plains NY)からのPK228L樹脂)を有する。この樹脂による処理により、カドミウム、銅、鉛、またはニッケルの全含有量の変化はなかった。

【0100】

c) Silicycle SiliaMet S (登録商標) イミダゾール樹脂

【0101】

第3の試験樹脂は、イミダゾール基で官能化されたシリカゲル樹脂(Silicycle (Quebec, Canada)からのSiliaMet S (登録商標) イミダゾール樹脂)である。この樹脂の2つの異なる変異体を使用した(イミダゾール200mgの樹脂及びイミダゾール500mgの樹脂)。この樹脂による処理により、カドミウム、銅、鉛、またはニッケルの全含有量の変化はなかった。

【0102】

d) Silicycle SiliaMet S (登録商標) TAAcOH及びTAAcONa樹脂

【0103】

第4の試験樹脂は、1) トリアミンテトラ酢酸(TAAcOH)基で官能化されたシリカゲル樹脂(Silicycle (Quebec, Canada)からのSiliaMet S (登録商標) TAAcOH樹脂)、及び2) トリアミンテトラ酢酸ナトリウム塩(TAAcONa)基で官能化されたシリカゲル樹脂(Silicycle (Quebec, Canada)からのSiliaMet S (登録商標) TAAcONa樹脂)の2つの樹脂の組み合わせ(当量)である。製造業者に従って、より高い振とう速度及び/または温度上昇で、場合によってはより高い掃気率を達成することができ、したがって、これらのパラメータを改変して、それぞれの効果を評価した。

【0104】

あるタンパク質濃縮物の試料を上記のように処理した。あるタンパク質濃縮物の試料を、1時間ではなく3時間、TAAcOH/TAAcONa樹脂を用いて振とうした。あるタンパク質濃縮物の試料を、1時間ではなく6時間、TAAcOH/TAAcONa樹脂

10

20

30

40

50

を用いて振とうした。あるタンパク質濃縮物の試料を振とうせず、その代わりに、TAAcOH/TAAcONa樹脂を用いて60℃で3時間加熱した。あるタンパク質濃縮物の試料を振とうせず、その代わりに、TAAcOH/TAAcONa樹脂を用いて60℃で6時間加熱した。あるタンパク質濃縮物の試料を、2倍量のTAAcOH/TAAcONa樹脂を用いて1時間振とうした。

【0105】

TAAcOH/TAAcONa樹脂を用いて、混合物を60℃で加熱することによって、またはTAAcOH/TAAcONaを用いて、混合物を3時間振とうすることによって、金属含有量の最大の低減が達成された。これらの処理により、金属の大部分を50%超低減した。カドミウム、銅、鉛、及びニッケルについて得られた結果を以下の表1に提供する。

【0106】

【表1】

表1. SiliaMetS TAAcOH及びTAAcONa樹脂処理 ($\mu\text{g/g}$)

試料	カドミウム	銅	鉛	ニッケル
対照	12.7 843	51. 564 8	0.49 39	0.78 11
TAAcOH/TAAcONa振とう	8.21 06	31. 207 8	0.08 21	0.37 97
TAAcOH/TAAcONa加熱	6.27 63	*	0.11 68	0.44 34

*検出限界を下回る

【0107】

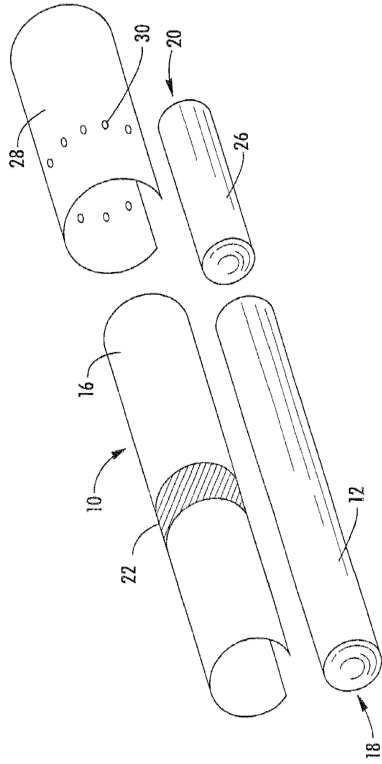
実施例10—超臨界抽出

スプレー乾燥形態のタンパク質濃縮抽出物の試料を抽出容器に加え、10容量%のエタノールを用いて超臨界二酸化炭素を含む溶媒と接触させる。10mPaの圧力及び約40℃の温度で抽出を行う。タンパク質濃縮抽出物の対照試料と抽出材料との間でニコチンピーク面積を比較することによって、ニコチンが超臨界抽出により約80%低減されたことを判定する。超臨界抽出前及びその後の濃縮物の臭気は、非公式に評価され、超臨界抽出後に弱まることに留意されたい。

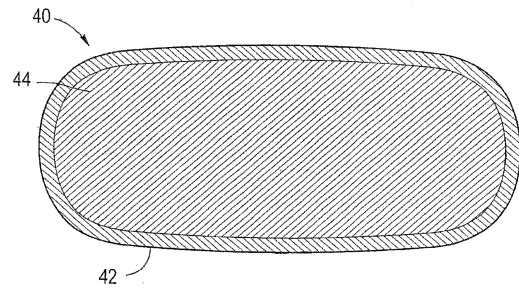
【0108】

本発明の多くの変更及び他の実施形態は、前述の説明に提示されている教示を利用できる本発明が関係する当業者に発想をもたらすことになる。したがって、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されるべきではなく、その変更及び他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図していることを理解されたい。本明細書において特定の用語が採用されているが、これらは、一般的かつ説明的な意味でのみ使用されており、限定することを目的としてはいない。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 2 3 K	50/45 (2016.01)	A 2 3 K 50/45
A 2 3 K	10/30 (2016.01)	A 2 3 K 10/30
A 6 1 K	36/81 (2006.01)	A 6 1 K 36/81
A 6 1 K	8/97 (2017.01)	A 6 1 K 8/97
A 6 1 K	8/00 (2006.01)	A 6 1 K 8/00

- (72)発明者 バード, クリスタル・ダウン・ヘッジ
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27295、レキシントン、ジョージ・ヘッジ・ロード・603
- (72)発明者 ジャクソン, タデウス・ジュード
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27265、ハイ・ポイント、ペムバートン・ウェイ・3733
- (72)発明者 ベッツ, チェルシー・アリソン
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27103、ウィンストン・セーラム、ハーク・リッジ・サークル・1022
- (72)発明者 ムーア, ジョニーポール
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27006、アドバンス、レッドメドウ・ドライブ・152
- (72)発明者 フォード, カイル
アメリカ合衆国、ノース・カロライナ・27019、ジャーマントン、ソーラタウン・ロード・1520

審査官 岩瀬 昌治

- (56)参考文献 特表昭58-500737 (JP, A)
国際公開第2004/104027 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|---------|--------|
| A 2 4 B | 15/26 |
| A 2 3 J | 1/00 |
| A 2 3 K | 10/30 |
| A 2 3 K | 50/45 |
| A 2 3 L | 33/10 |
| A 2 3 L | 33/17 |
| A 6 1 K | 8/00 |
| A 6 1 K | 8/97 |
| A 6 1 K | 36/81 |
| C 0 7 K | 14/415 |