

# 葉煙草 人工 熟成中의 微生物에 關한 研究

서울大學校 農科大學 農化學科

梁且範 · 全在根 · 金在薰\* · 裴孝元\*

(1966年 4月 5日 受理)

## A study on microorganisms during the tobacco fermentation

C.B.Yang, J.K.Chun, and J.H.Kim\* H.W.Bae\*

College of Agriculture, Seoul National University

### Summary

A study was carried out to investigate the microorganisms and their floral changes during the tobacco fermentation. The results were summarized as follows.

I. The molds in the "tobacco leaves" were isolated and identified as follows;

*Aspergillus flavus* Link, *A. restrictus* G. Smith, *A. nidulans* (Eidam) Wint, *A. awamori*, *Oidium* sp., *Edmundmasonia* sp., *Spicaria* sp.

II. The bacteria in the tobacco were isolated and identified as follows;

*Bacillus subtilis*, *B. subtilis* var *aterrium*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. Pumilus*, *B. megaterium*, *Flavobacterium harrisonii*, *Aerobacter aerogenes*.

III. The counts of the microorganisms on leaves taken from bulks of the fermenting leaf tobacco revealed the presence of relatively small number on the initial stage of the fermentation.

During the tobacco fermentation the number of molds increase gradually to the maximum until the 14th. day of the fermentation, followed by showing, the plateau, and the bacteria population revealed the maximum on the 7th. day, then declined slowly.

### 緒論

葉煙草에 附着되거나 棲息하는 微生物로는 *Bacillus*, *Micrococcus*<sup>(1)</sup>와 *Aspergillus*, *Penicillium*<sup>(2)</sup> 屬들의 菌株들이 알려져 있다. 近來 이들 微生物群中에서

*Micrococcus* 와 *Bacillus* 屬의 몇 개 菌株들은 葉煙草의 熟成도 중 nicotine, protein<sup>(3)</sup>과 같은 葉煙草의 主要成分을 變化시켜 담배의 質과 맛에 顯著한 影響을 주고 있음이 報告되어 있다.<sup>(4)</sup> 著者等은 葉煙草의 人工熟成機構을 究明하기 為한 一聯의 研究로써 韓國產 葉煙草의 人工熟成中에 關與하는 微生物들을 과 이들의 消長을 觀察할 目的으로 本實驗을 試圖하였으며, 여기에 그 結果를 報告하는 바이다. 本實驗을 서울大學校 農科大學長 金浩植博士의 指導하에서 이루진 것이다.

### 實驗

1. 試料; 서울 中央專賣廳【技術研究所】醸酵室로부터 乾球 39°C 濕球 35°C 關係溫度 75% 下에서 熟成中인 黃色種葉煙草를 經時的으로 採取하여 이를 本實驗의 試料로 하였다.

2. 方法:

a, 酒糟의 分離, 生菌數 測定 및 同定

Koji extract (煙草粉末 15 g 을 Koji extract 1 l에 加하여 100°C에서 1時間 抽出後 濾過한다) agar 上에서 外觀上 形態가 다른 獨立 colony 들을 分離하고 Strain No. 를 둘여 次後 生菌數의 測定을 試圖하는 한편 malt extract agar, czapek agar 에서의 培養上 特徵과 形態學의 特徵을 檢鏡하여 同定하였다.<sup>(4)</sup>

b, 細菌의 分離, 生菌數測定 및 同定

T.G.Y-Tobacco extract agar (Tryptose, 5.0 g, Glucose 1.0 g, yeast extract, 5.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, agar 20 g 및 煙草粉末 15 g 을 물 1 l로 100°C에서 1時間 抽出한 濾液)와 sodium-thioglycolate 0.1% 含有

\* 中央博賣技術研究所

T.G.Y-tobacco extract agar에서 好氣 및 嫌氣性細菌을 分離, 生菌數를 測定하였고, [培養, 形態, 生理的 特性實驗을 常法<sup>(5)</sup>에 準하여 行하고 Bergey's manual 等<sup>(6,7)</sup>에 依해 同定하였다(表 II-a.b.c. 之 참조).

## 結果 및 考察

### 1. 人工熟成中 微生物의 分布

醣酵開始日로부터 7日間隔으로 採取한 試料中の 곰팡 및 細菌別 總生菌數의 經時的 滅長은 Fig. 1에 서와 같이 初期 一週日間은 곰팡이나 細菌이 모두 急激한 增加를 보였고 其後 細菌은 變化가 없었다. 한편 嫌氣性細菌은 全熟成期間을 通하여 關與하지 않았다.

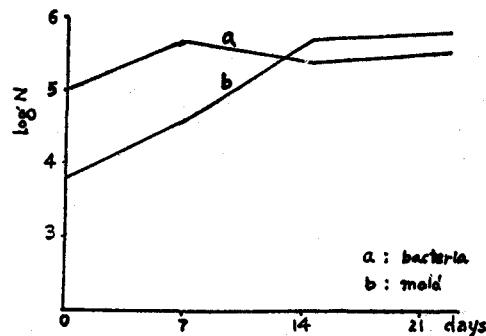


Fig. 1 Floral changes during the fermentation  
N: number of organism gm

### 2. 곰팡의 同定

Koji extract 塑天 培養基上에서 分離한 곰팡에 對하여, 培養上の 特徵과 形態檢鏡結果에 따라 各分離菌株를 Table 1과 같이 同定하였다. 이들은 大部分 Aspergillus 屬이었고 그外에 Monilia 屬이 있었으며 이 不完全菌은 煙草의 病源菌에서 유래된 것 같다

Table 1. The identification result of the molds

Strain No.	Name of microorganism identified.
1. 2.	Aspergillus flavus link
3.	A. restrictus F. smith
4.	A. nidulans
5.	A. awamori
6.	Oidium sp.
7.	Edmundmasonia sp.
8.	Spicaria sp.

### 3. 細菌의 同定

分離한 各菌株에 對하여 培養, 形態的 特徵을 調査하고 同一한 樣相을 보이는 것에, 同一한 Strain No.를 붙이고 生理 및 醣酵試驗을 行한 結果 Table II-a, II-b, II-c. 와 같고 이로부터 Table III과 같이 同定하였다.

Table II-a. 細菌의 培養 및 形態的 特徵

Table II-b. 細菌의 生理的 特徵

Table II-c. 細菌의 灰水化物 醣酵上의 特徵.

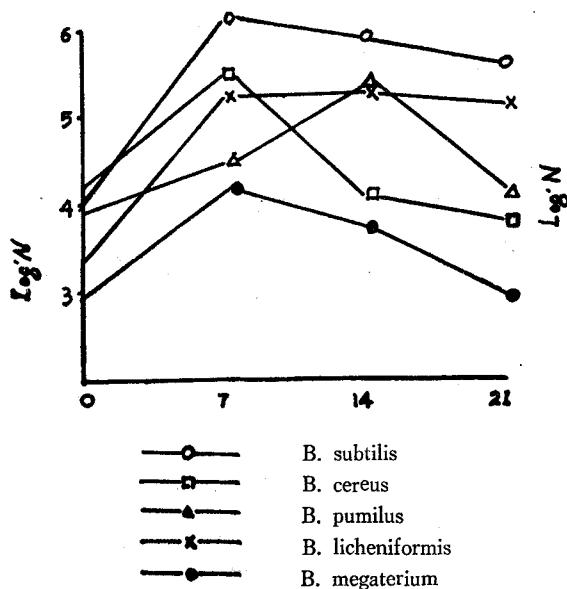


Fig. 2. Population of the mold during the fermentation

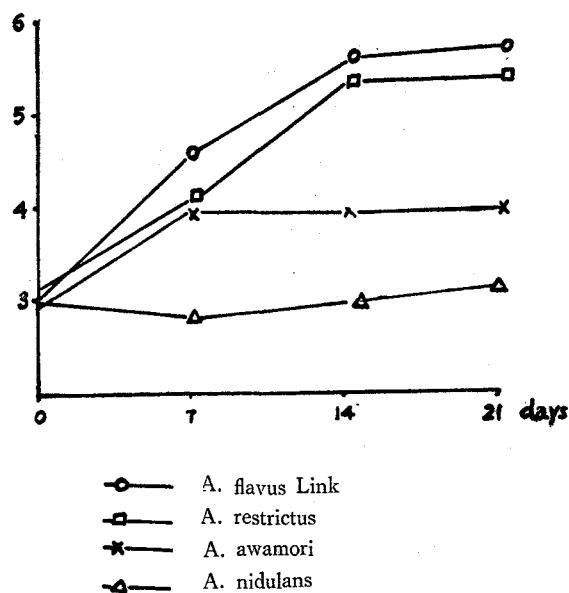


Fig. 3. Population the bacteria during the fermentation

Table I-a The Cultural and Morphological Characteristics

Strain No.	Cultural Characteristics										Morphological Characteristics					
	agar colony			nutrient broth			agar-stroke				vegetative cell		endospore		gram stain	motility
	form	Surface	color	surface	cloudy	sediment	on agar	on dextrose	form	color	form	color	shape	size(μ)	presence	size(μ)
1	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	-	rod.	0.7~0.8×1.7~2.9	+	0.7×1.0	+	+
2	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	C R	"	0.8~0.9×1.9~2.9	+	0.8×1.0	+	+
3	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	-	"	0.7~0.8×2.0~2.6	+	0.7×1.0	+	+
4	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B R	"	0.7~0.9×2.0~3.0	+	0.8×1.0	+	+
5	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	-	"	0.6~0.8×2.3~3.0	+	0.6×1.0	+	+
6	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	C R	"	0.7~0.9×2.0~2.6	+	0.7×1.0	+	+
7	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B R	"	0.8~0.9×2.0~2.5	+	0.8×1.1	+	+
8	C I	S Y.G	P E	+	+	F L	Y	F L	Y	"	0.3×1.1~1.3	-	-	-	+	+
9	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B R	"	0.9~1.0×2.0~3.0	+	0.7×1.0	+	+
10	C I	S	-	P E	+	+	F L	W.Y	F L	Y	"	0.4~0.5×1.0	-	-	-	-
11	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	-	"	0.7~0.9×2.0~3.0	+	0.7×1.0	+	+
12	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	-	"	0.6~0.9×1.7~2.6	+	0.7×1.0	+	+
13	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B R	"	0.9~1.0×1.9~3.0	+	0.7×1.1	+	+
14	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B L	"	0.8~0.9×1.9~1.5	+	0.8×1.1	+	+
15	I R	R G	W	P E	+	+	E C	-	E C	-	"	0.7~1.1×1.6~3.0	+	0.7×1.1	+	+
16	I R	R G	W	P E	+	+	A R	-	A R	-	"	0.9~1.1×2.1~2.5	+	1.0×1.3	+	+
17	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	C R	"	0.8~0.9×1.9~2.9	+	0.7×1.1	+	+
18	C I	S W.Y	P E	+	+	A R	-	A R	Y	"	0.6~0.6×0.7~2.5	+	0.6×1.0	+	+	
19	I R	S W	-	+	+	F L	Y.B	F L	Y.B.	"	1.2~1.7×2.5~4.2	+	0.9×1.5~1.9	+	+	
20	C I	S W.Y	P E	+	+	A R	-	A R	Y	"	0.7~0.8×1.9~2.3	+	0.6×1.1	+	+	
21	C I	S W.Y	P E	+	+	A R	-	A R	Y	"	0.6~0.8×1.8~2.7	+	0.6×0.9	+	+	
22	C I	S W.Y	P E	+	+	A R	-	A R	Y	"	0.6~0.8×1.8~2.3	+	0.6×1.0	+	+	
23	C I	R G	W	P E	-	+	A R	-	A R	B R	"	0.7~0.9×2.0~3.2	+	0.7×1.0	+	+
24	I R	R G	W	P E	+	+	F L	-	F L	-	"	1.0~1.2×2.4~3.5	+	0.9×1.3~1.7	+	+
25	I R	R G	W	R	+	+	A R	-	A R	-	"	1.0~1.6×3~4.2	+	1.0×1.5	+	+
26	I R	S Y	-	+	+	F L	Y.B	F L	Y.B.	"	1.1~1.5×2.0~4.0	+	0.8~1.1×1.6	+	+	

Abbreviation; CI; circular, IR; irregular, S; smooth, RG; rough, AR; arborescent  
EC; echinulate, FL; Filiform, R; ring, W; white, Y; yellow G;  
green, B; brown, BL; black. +; positive or presence, -;  
negative or absence.

Table II-b The Physiological Characteristics of the Bacteria

Strain No.	Relation to				Growth on		Reaction				Production					
	temperature				oxygen	Potato slant	7%—NaCl		Litmus milk		acid or alkaline reduction	peptization rennet indole				
	16~18°C		28~30°C				38~40°C		45~50°C							
	+	+	+	+			+	+	+	+						
1	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	-	#				
2	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
3	+	+	+	+	A	Y.B	#	+	#	#	+	#				
4	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
5	+	+	+	+	A	Y.B	#	+	#	#	+	#				
6	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
7	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
8	#	+	+	+	M	Y	#	+	#	#	+	#				
9	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
10	+	+	+	+	F	Y	#	+	#	#	+	#				
11	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
12	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
13	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
14	+	+	+	+	A	BL	#	+	#	#	+	#				
15	+	+	+	+	A	W	#	+	#	#	+	#				
16	+	+	+	+	A	W	#	+	#	#	+	#				
17	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
18	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
19	+	+	+	+	F	W	#	+	#	#	+	#				
20	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
21	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
22	+	+	+	+	A	Y	#	+	#	#	+	#				
23	+	+	+	+	A	Y.P	#	+	#	#	+	#				
24	+	+	+	+	F	W	#	+	#	#	+	#				
25	+	+	+	+	A	P	#	+	#	#	+	#				
26	+	+	+	+	P	W	#	+	#	#	+	#				

Abbreviation: ;growth or positive, —; no growth or negative, ±; doubt A; aerobic,

M; microaerophilic, F; facultative aerobic Y; yellow, W; white, pink,

BL; black AL; alkali, AC; acid.

Table II-C The Characteristics of the Sugar Fermentation of the Bacteria

Strain No.	tryptose base						ammonium phosphate base					
	glucose	mannitol	lactose	maltose	glucose	mannitol	sucrose	arabinose	xylose	glycerol	lactose	maltose
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

abbreviation; +; acid produced, -; no acid produced. g; gas formed.

Table III. The Identification Result of the Bacteria

Strain No.	Bacteria identified
T-2, T-4, T-6 T-7, T-9, T-13, T-17, T-23	<i>Bacillus subtilis</i>
T-14	<i>Bacillus subtilis var aterrimus</i>
T-1, T-3, T-5, T-11, T-12	<i>Bacillus licheniformis</i>
T-15, T-16, T-25, T-24	<i>Bacillus cereus</i>
T-18, T-20, T-21, T-22	<i>Bacillus pumilus</i>
T-19, T-26	<i>Bacillus megaterium</i>
T-86	<i>Flavobacterium harrisonii</i>
T-10	<i>Aerobacter aerogenes</i>

#### 4. 微生物의 菌株別 經時的分布

人工熟成全期間에 걸쳐 主로 關與하는 *Aspergillus* 와 *Bacillus* 屬菌株들에 限하여 經時的 分布를 보면

Fig. 2, 3 과 같이 *A. flavus.*, *A. restrictus* 와 *B. che-nismis* *B. subtilis* 가 가장 큰 分布를 나타내었다.

#### 要 約

葉煙草人工熟成에 關與하는 微生物들을 分離하고 分離菌株에 對하여 培養, 形態, 生理 및 灰水化物 酵酵試驗을 行하고 이 結果들로부터 이들 微生物群을 各各 *Aspergillus gavus*, *A. restrictus*, *A. nidulans*, *A. awamori*, *Oidium* sp., *Edmundmasonia* Sp. *spicaria* Sp., *Bacillus subtilis*, *B. subtilis var aterrimus*, *B. licheniformis* *Flavobacterium harrisonii*, *Aerobacter aerogenes* 으로 同定하였다.

그리고 이들 菌株中에서 酵酵全期間에 걸쳐, 關與한 것으는 *Aspergillus flavus*, *A. restrictus*, 와 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* 이었고 이 과정과, 細菌은 各各 14, 7 日間에 最高分布量 이루었으며 其後에는 뚜렷한 分布의 變化를 보이지 않았다.

#### 參 考 文 獻

- 1) B. R. Choman, A.S. Abdel-Ghaffar; Bacterial proco 54 21, 1954.
- 2) 小島式郎, 金井功; 日本專賣公社中央研究所 研究報告 96 1956.
- 3) A. Izquierdo Tomayo, A. medeiros Alvarez; Actes. Congr. Sci. Intern. Tobacco, 682~90, 1958.
- 4) L. Guzeley & S. Geogiev; Bulgar. Tyrtym 7 No. 2 32~7, 1962.
- 5) M.J. Pelezar; Manual of Microbiological Methods.
- 6) Breed R.S., Murray E.G. and Smith N.R.; Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 7 th ed., 1957.
- 7) Kenneth L. Burdon; Journal of Bacteriology 71 No. 1 27, 1956.