

# 醱酵담배에서 細菌의 同定 및 그 細菌處理가 靑臭葉品質에 미치는 영향

李根會 · 梁光圭

韓國煙草研究所 醱酵研究室

(1979, 3. 16 접수)

## Identification of Five Strains of Bacteria Isolated from the Fermented Tobacco Leaves and Microbial Effects of them for the Quality Enhancement of the Greenish Tobacco Leaves.

Keun Hwe Lee and Kwang Kyu Yang

Lab. of Fermentation, Korea Tobacco Research Institute

(Received March 16, 1979)

### 초 록

香草 醱酵葉과 Perique 葉으로 부터 細菌을 분리하여 니코틴 분해능과 생육상태를 조사한후 우수 세균을 선발하였다. 선발세균은 H-81, P-5, P-7은 *Bacillus*, H-82: *Pseudomonas*, P-4: *Corynebacterium* 으로 同定하였다. 이들 細菌을 靑臭葉에 처리 발효한 결과 대체로 산소흡수량과 pH, 니코틴이 낮아졌고 휘발성 유기산, 석유에텔추출물이 증가되었다. 한편 色沢은 靑色에서 黑褐色으로 變化되었으며 靑臭味도 除去되고 그에 따른 香嗅味도 좋아졌으나 특히 H-82인 *Pseudomonas*가 가장 양호한 결과를 나타내었다.

### Abstract

In order to improve the quality of greenish tobacco leaves, fermentation experiments by microbial treatment and periodical variations of fermentation temperature were performed.

More than twenty strains were isolated from Hyangcho (Sun cured Korean native leaves) and Perique tobacco leaves. Among them, five strains which showed good growth in Nicotine Broth medium were selected.

Identification experiments of these strains as well as checking the effects of fermentation by these treatment on the quality and aging rate of greenish tobacco leaves were carried out.

The results were like following :

1. Selected strains were identified as *Pseudomonas* for H-82, *Corynebacterium* for P-4 and *Bacillus* for H-81, P-4 and P-7.
2. Among the five strains, strain H-82 showed the best effect on the forced aging and the quality of greenish tobacco leaves. The rate of oxygen uptaking,

pH and nicotine contents were decreased. However, total volatile acids and petroleum ether extracts were increased.

3. After fermentation, taste from greenish tobacco leaf were removed and smoking characteristics were improved. Color was also changed from greenish yellow to dark brown.

## I. 緒 論

黃色種 잎담배는 일반적으로 수확건조후 再乾燥를 거쳐 장기간 자연숙성시키므로서 未熟葉의 靑臭와 雜臭가 제거되어 喫味が 좋아지며 色澤도 鮮黃色에서 橙黃色, 黃褐色을 거쳐 褐色化된다. 이와같이 2年동안 장기숙성 시키는데는 원료의 수요난과 저장비용등이 막대하여 人工早期熟成 方案에 의한 연구가 계속되어 왔다. 1891年 Suchsland 가 잎담배의 喫味向上이 醱酵에 依한다는 발효설을 提唱한후 Loew, Johnson등은 미생물과 그 분비효소 및 葉中에 존재하는 각종 효소의 작용이 잎담배 숙성에 관여한다고 보고했다. 그리고 Gibson 과 Izquiedo는 잎담배의 단백질과 니코틴이 미생물에 의해 분해된다고 했으며 Guzelen은 잎담배에 부착된 糸狀菌이 담배의 香臭味에 관계있음을 보고하였다 한편 1950年 Frankenburg는 잎담배의 堆積醱酵와 自然熟成時 화학성분의 변화, 酵母에 의한 니코틴분해, 細菌에 의한 니코틴분해경로 추

적등에 대해 검토하였다. 국내에서는 藪가 酵母에 의한 황색종 잎담배 숙성촉진연구를 실시하였다. 70년대에는 미생물에 의한 잎담배 인공 발효연구가 細菌을 활용하는 방향으로 진전되고 있으며 (Coussirat, Geiss, Newton) 온도와 잎담배 수분의 조정에 의한 오리엔트엽 早期熟成 (Bartolucci), Burly葉의 高温醱酵 (Chakraborty, Giovannozzi), 變溫處理에 의한 香臭味改善등으로 잎담배 醱酵方法이 시도되고 있다. 그러나 잎담배 재배중 未熟葉을 收穫乾燥時 많이 나오는 靑臭葉은 長期間 自然熟成시켜도 靑臭가 除去되지 않음은 물론 香臭味가 不良하기 때문에 이들의 改善을 위해서 그동안 많은 연구가 실시되었으나 效果的인 除去方法이 설정되지 않은 상태에 있다. 따라서 本研究은 靑臭葉의 香臭味 改善과 靑臭의 除去를 위해 醱酵葉으로부터 細菌을 分離하여 담배에 有用한 優秀細菌을 選拔하고 그 特性을 調査하였다. 그 선발세균들을 靑臭葉에 接種발효하고 變溫處理하여 短期間에 靑臭의 除去와 喫味の 개선을 시도하였다.

Table 1. Composition of Media for Isolation and Culture.

	Nicotine Agar and Broth	Tobacco Extract Broth
Nicotine	4.0 ml	
FeSO <sub>4</sub>	0.025 gm	0.05 gm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 gm	4.0 gm
KCL	5.0 gm	10.0 gm
MgSO <sub>4</sub>	0.25 gm	0.5 gm
Yeast Extract	0.1 gm	0.2 gm
Agar	15.0 gm	
Tap Water	1000 ml	10 (%) Tobacco Extract to make 1 liter
pH	6.8	6.8

## II. 實 驗

### 1. 細菌分離

香草葉을 加湿하여 葉水分 30%에서 40~50°C로 5日間 高温醱酵하여 얻은 香草醱酵葉과 Perique葉을 滅균수로 희석(2%, w/v)한 다음 30°C에서 28시간 배양시킨후 Nicotine Agar and Broth(표1)로 희석법에 의해 20株의 細菌을 分離하였다.

### 2. 니코틴 分解力 檢討

니코틴 0.2~0.5% Broth 배지에서 眞탕배양(30°C, 24시간)후 니코틴 감소량을 測定 比較하였다.

### 3. 담배 抽出物에서의 生育狀態調查

Tobacco Extract Broth(표1)에 接種한 후 眞탕배양(30°C, 48시간)액을 희석법(30°C, 24시간)에 의해 ml당 Colony수를 측정 生育상태를 比較하였다.

### 4. 細菌選抜 및 同定

分離細菌을 니코틴分解力과 眞담배 抽出物에서 生育狀態를 比較하고 細菌 5株를 選抜하여 Pelzer, Breed, Cowan의 方法에 따라 特性을 調査하여 同定하였다.

### 5. 細菌培養 및 眞담배에 處理醱酵

가) 細菌培養: Tobacco Extract Broth로 培養(30°C, 48시간)하고  $10^5 \sim 10^6$  cell/ml로 희석하여 眞담배에 分무처리하였다.

나) 眞담배 試料: 78년 대子産 育臭葉 Hicks 후엽.

다) 處理 및 醱酵條件: 세균배양액을 희석( $10^5 \sim 10^6$  cell/ml)하여 眞담배 수분을 20~27%가 되도록 分무처리한후 온도 30°C로 5일간 발효하고 이어서 60°C와 실온으로 5일간 격일간격으로 온도를 변화시켰다.

라) 발효엽의 이화학성 조사

니코틴, 전질소, 석유에텔추출물: 당연구조공

정분석법에 의했다.

pH: 粉末시료 2g에 증류수 100ml를 加하고 15분간 眞탕시킨후 餘과하여 pH-meter(Corning EFL M-12)로 측정했다.(Noguchi)

酸素吸收量: Noguch의 方法에 準하여 Warburg 檢圧計(B-Braun, V-85)를 使用했으며 粉末 1g에 대한 1시간의 산소 흡수량을 ul로 표시했다.

揮發性有機酸: Noguch 方法에 準하여 粉末시료 10g에 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ml, 아세톤 200ml를 넣고 眞탕기로 1시간 추출하였다. 추출액은 glass filter로 餘과하였다. 잔사를 아세톤 50ml로 2회 세척 餘액과 세액을 합한후 10% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 10ml를 加해 알카리성으로 한 다음 60°C수조에서 아세톤을 증발시켰다. 다음에 농황산 5ml를 加하여 강산성으로 하고 증류속도 3~4 ml/min으로 수증기 증류하였다. 유출액 100ml를 취하여 Phenolphthalein 지시약으로 0.02N-NaOH로 적정 휘발성산량을 Acetic acid로 산출하였다.

평형함수량: 담배분말 시료를 다음과 같은조건으로 구분하여 베시케타 내에서 20°C, 24시간 동안 수분을 평형시킨후 함수량을 측정하였다. (Merck Index)

(i) 상대습도 93%, monobasic Ammonium-phosphate 포화용액.

(ii) 상대습도 80%, Ammonium sulfate 포화용액.

## III. 結果 및 考察

### 1. 細菌分離 및 選抜

香草醱酵葉과 Perique葉에서 20株의 細菌을 分離하였고 Nicotine Broth와 Tobacco Extract Broth에서 니코틴분해력과 生育상태가 좋았던 5株의 세균을 선발하였다. 이들 세균의 니코틴 분해력은 33~65%이었고 이때의 菌數는  $10^8 \times 2$  cell/ml이었다. 한편 Newton은 동일배지에서 Pseudomonas putida의 니코틴 분해력은 98.6%라고 보고하였으며, 内田은 무기물

조성을 달리한 배지에서 *Arthrobacter*는 75%이며 이때의 균수가  $10^9 \times 8 \text{ cell/ml}$ 라고 발표하였다. 따라서 본 연구결과는 니코틴 분해력이 이들보다는 다소 낮은 것으로 나타났으나 균수는 비슷한 결과를 보였다. 표 2와 같이 실험한 균주중 H-82가 니코틴분해력은 물론 생육상태도 가장 우수하였으며 이 균주의 배양일수에 따른 분해력 및 생육상태를 보면 그림 1에서와 같이 배양 2일까지 균주의 증식과 니코틴 분해가 급격히 일어나나 그 후부터는 큰 변화가 없었다. 이와같은 결과로 세균 처리에 의한 청취엽의 품질개선은 세균처리시 48시간정도 배양시킨후 잎담배에 접종하는 것이 가장 이상적

인 것으로 생각된다.

## 2. 선발세균의 동정

표 3.4와 같이 形態的, 生理的 特性을 調査 하였으며 Cowan과 Breed의 分類表에 따라 H-81 : *Bacillus*, H-82 : *Pseudomonas*, P-4 : *Corynebacterium*, P-5 : *Bacillus*, P-7 : *Bacillus*, 로 同定되었다.

## 3. 靑臭葉에 細菌處理

가) 잎담배에 세균처리후 30°C, 5일간 발효과정중 수분은 초기에 23%였고 생균수  $10^4 \times 2 \text{ colony/g}$ 을 보였으나 5일간의 발효종료후

Table 2. Degradation of Nicotine by Selected Strains.

Strain No	Degradation of Nicotine (%) Nicotine Broth (0.2%) 30°C, Shaking, 24 hrs	Number of Cell (colony/ml) Tobacco Extract Broth 30°C, Shaking, 48 hrs
Control	5	
H-81	48.1	$10^6 \times 3$
H-82	65.2	$10^8 \times 2$
P-4	32.8	$10^4 \times 5$
P-5	62.5	$10^7 \times 6$
P-7	57.3	$10^7 \times 7$

Table 3. Morphological Properties of Selected Bacteria.

Strain No	H-81	H-82	P-4	P-5	P-7
Form	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Motility	-	-	-	-	-
Colony form on Nutrient Agar	Yellow Circular Convex	Gray white Circular Convex	Yellow Circular Convex	Yellow irregular Flat	Yellow Circular Convex
	Pulvinate Echinulate	Entire Echinulate	Undulate Echinulate	Lobate Arborenscent	Undulate Filiform
Gram Stain	+, -	-	+	+	+, -
Acid Fast Stain	-	-	-	-	-
Pore Stain	+	-	-	+	+

\* +; Positive, -; Negative, +, -; Variable

Table 4. Physiological Properties of Selected Bacteria

Strain No.	H-81	H-82	P-4	P-5	P-7
Catalase activity	+	+	+	+	+
Oxidase activity	+	+	+	-	+
O/F. Test	-	-	-	-	-
Reduction of nitrate	-	-	+	-	-
Production of Indol	-	-	-	-	-
Arginine Hydrolysis	-	-	+	-	-
Urease Activity	-	-	-	-	-
Production of H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
Methyl Red Test	+	+	+	+	+
V.P. Test	+	-	+	+	+
Relation to Oxygen	+	+	+	+	+
Acid from Arabinose	+	-	-	-	-
Sucrose	+	+	-	+	+
Manitol	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+
Simmons citrate	-	-	-	-	-
Gelatine Liquefaction	+	+	+	-	-
Source	Tobacco Leaves				
	Hyang Cho Korean		Perique		
	Native Sun-Cured				
Genus	<i>Bacillus Pseudomonas Corynebacterium</i>			<i>Bacillus Bacillus.</i>	

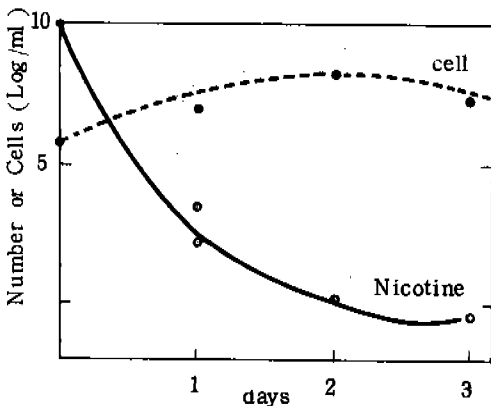


Fig. 1 Degradation of nicotine in tobacco extract broth (Nicotine 0.2%) by strain No. H-82

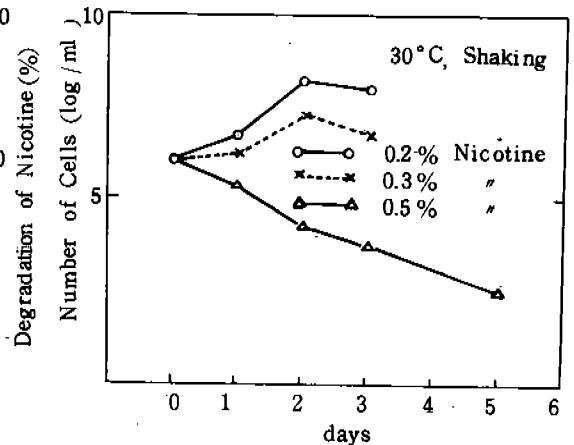


Fig. 2 Effect of nicotine concentration on growth of *Pseudomonas* (H-82)

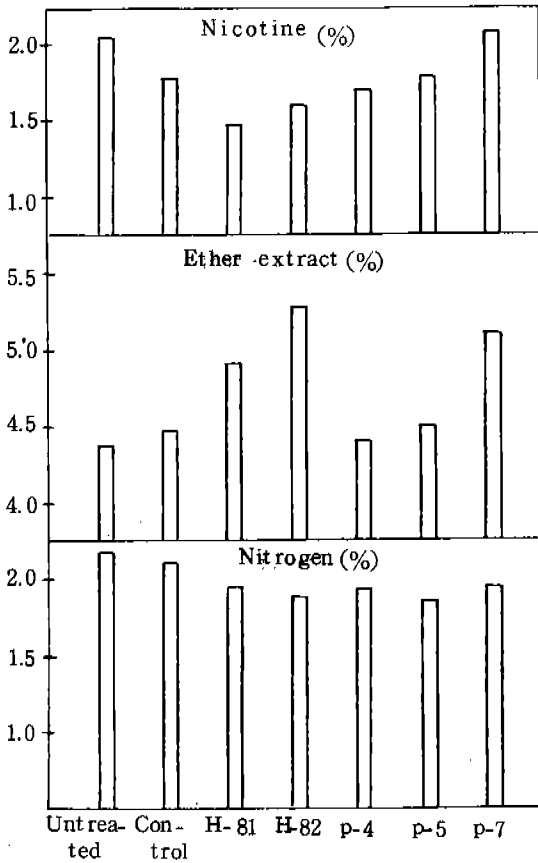


Fig. 3 The Changes of the various chemical components in the fermented greenish tobacco leaves (Hicks, *Nicotiana Tabacum* L.) by Selected Strains

에는 수분 19%, 생균수  $10^3 \times 5$  colony/g 이 되어 잎담배에서 세균증식이 되지 않았으며 곰팡이의 군사가 나타났다. 세균처리 5일후 60°C로 변온처리하여 수분 14%, 생균수는  $10 \times 8$  colony/g으로 감소되었으며 변온처리로서 곰팡이의 군사는 나타나지 않았고 저장성이 좋아졌다.

나) 발효속성 지표인 pH와 산소 흡수량은 그림 4와 같이 낮아졌으며 휘발성유기산은 증가되었다. 세균에 의한 담배 발효시 일반적으로 pH가 높아지는 경향이 나 본 실험에서는 세균에 의한 발효후 高温(60°C)으로 變溫處理 과정을 거쳤기 때문에 pH가 낮아진 것으로 생각된다. 그림 4와 같이 세균을 처리하지 않고 수분만을

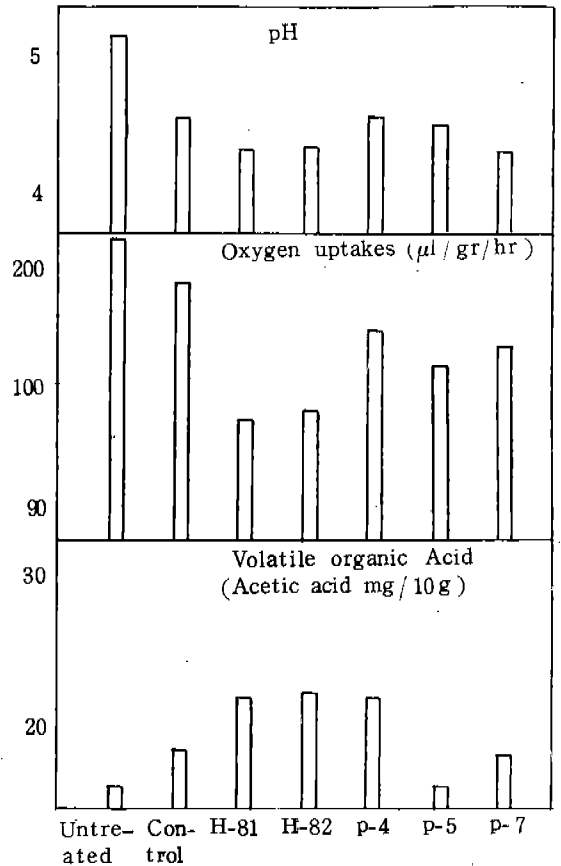


Fig. 4 The Changes of several chemical factors in the fermented greenish tobacco leaves (Hicks, *Nicotiana Tabacum* L.) by selected strains.

처리한 대조구 (Control)에서도 무처리구 (Untreated)에 비해서 pH가 낮아졌으며 玉置의 變溫處理에 따른 시험결과와 일치되는 현상을 나타냈다.

다) 窒素量의 變化는 적었으며 니코틴은 대조구(水分을 細菌培養液과 同量 處理한것)가 15%, H-82처리구가 26% 감소되었다. 표 2와 그림 3에서와 같이 니코틴합성배지에서 니코틴분해력이 가장 좋았던 H-82가 65% 감소되었는데 잎담배에 처리시도 가장 많은 감소를 보였다. 잎담배의 수분함량이 낮아 세균의 증식 조건이 나쁘기 때문에 잎담배에 처리발효시 니코틴의 감소가 적은 것으로 나타났다. 석유에 벤츄출물은 무처리구가 4.31%에서 H-82 처

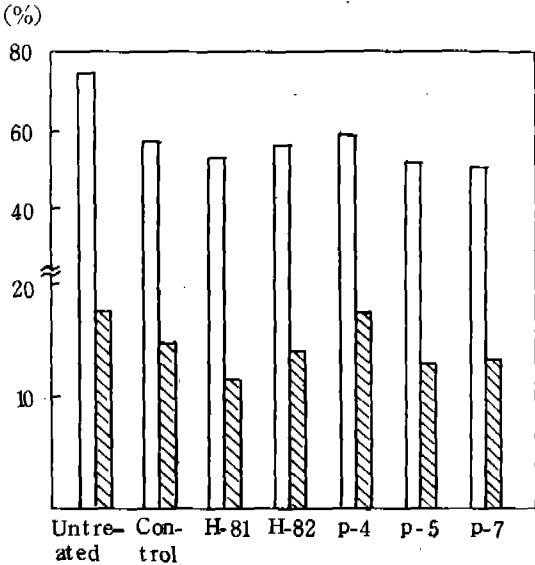


Fig. 5 Equilibrium moisture content of fermented tobacco leaves

▨ : Relative Humidity 80%, Temp, 20°C  
 □ : Relative Humidity 93%, Temp, 20°C

리구는 5.44%로 증가되어 방향성이 개선된 것으로 보였다.

라) 평형함수량은 대조구와 세균처리구 모두 현저히 감소되었다. 일반적으로 잎담배를 장기간 자연숙성 시킬 때는 평형수분이 서서히 감소되고 堆積醱酵(強醱酵, 40%이상의 水分含量) 때에는 급격히 감소되는데 本 實驗에서는 퇴적발효의 경우와 유사한 결과를 나타내었다. (그림 5)

마) 醱酵葉의 色澤은 세균처리발효 5일간은 서서히 褐變하였으나 變溫處理時에 급격히 黑褐色으로 되었으며 靑臭가 除去되고 香嗅味가 좋아졌다. 玉置의 變溫處理 結果에서 지적한바와 같이 本 실험에서도 고분자물질이 증가되고 방향성이 좋아지며 靑臭도 제거된 것으로 관찰된다.

바) 선발세균이 잎담배에서는 생장이 좋지 않고 니코틴 분해력이 未洽하므로 잎담배에서도 증식이 잘되는 세균의 분리가 요망된다. 그리고 加濕과 變溫處理에 依한 對照區에서도 靑臭味 除去와 嗅味向上이 되므로 變溫處理 方法의 改

善이 계속 연구 검토되어야 할것 같다.

### 参 考 文 献

1. Bartolucci. A., Proc. 2nd Intl. Sci. Tobacco 659. (1958).
2. Breed. R. S., "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7th Ed. The Williams & Wilkins. Baltimore. U. S. A. (1962).
3. Chakraborty. M. K., Indian. J. Agric. Sci. 42. 169. (1972).
4. Coussirat. J. C., A du Tabac-Sect 2. 11 Bergerac-S. E. I. T. A. (1974).
5. Cowan. S. T., "Manual for the Identification of Medical Bacteria" 2nd Ed., Cambridge University Press(1974).
6. Frankenburg. W. G., Advances in Enzymology 10. 325. (1950).
7. Geiss. V. L., U. S. Pat. 4.038.993(1977).
8. Gibson. T., Proc. Soc. Agr. Bacteriologists 13. (1943).
9. Giovannozzi. M., Actes. Deuxieme. Congress. Sci. Int. de. Tabac 605.(1958).
10. Guzelen. L., Georgien. D. S., Bulgar. Tutun 7. 3207. (1962).
11. Izquierdo. A., Tamayo. A., Actes. Congr. Sci. Int. Tabac. 682. (1958).
12. Johnson. J., J. Agr. Res. 49. (1934).
13. Loew. O., U. S. Dept. Agr. Rept. 59.34 (1899).
14. Newton. R. P., U. S. Pat. 4.037.609(1977)
15. Noguchi. M., Jap. Monop. Corp. Cent. Res. Inst. Sci. paper. 90. 33. (1954).
16. Noguchi. M., Jap. Monop. Corp. Cent. Res. Inst. Sci. paper. 111. 5. (1969).
17. Pelzyar. M. J., "Manual of Microbiological Methods" 2nd Ed. McGraw-Hill. (1957).
18. Suchsland. E., Ber. Deut. Bot. Gesell. 9.

79. (1891).  
19. Uchida. S., Jap. Monop. Corp. Cent. Res. Inst. Sci. paper 118. 197. (1976).  
20. The Merck Index, 9th Ed, Merck & Co. Inc. Raway. N. J. U. S. A. (1976).  
21. 玉置英之助. 日, 特公 48 - 18835(1973).  
22. 裴孝元 한국농화학회지 11. 1. (1970).