

# 담배 이분(泥粉)으로 부터 향을 생성하는 효모의 분리, 동정 및 그 향의 관능적 특성에 관한 연구

송치현 · 강은희 · 박은수

한국인삼연초연구소 원료연구실

## Identification of Yeasts Producing Flavor from Tobacco Powder and the Organoleptic Properties of Their Products

Chi Hyeun Song, Eun Heuy Kang, and Eun Su Park

Lab of Raw Materials,

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

(Received Sept. 25, 1981)

### Abstract

From various sources of natural habitat, yeasts, which could transform the constituents of tobacco powder into flavors, were isolated and three isolates, YO II, M4-1, and M19-1, were selected. These were identified, by their biological characteristics, as *Hansenula cifferri*, *Pichia acaciae* and *Candida tropicalis*, respectively.

Their ferments were extracted with petroleum ether and fractionated into basic, neutral and acidic fractions.

The major organoleptic properties of the fermented flavors were detected in the neutral fractions by the sensory test, and the yields and threshold values of those fractions were determined and the organoleptic characteristics were described as well.

### 서 론

일반적으로 잎담배는 후숙(aging)이 오래된 것일수록 향각미가 양호하여 수확, 건조후 제품의 원료로 투입되기 전에 가능하면 2~3년 정도 자연 후숙 기간을 두는데 이때 일어나는 변화의 기작에 대하여 많은 논의가 되어 왔다. 후숙인자에 대한 지금까지의 연구 결과에 의하면 화학적 요인, 잎의 효소, 잎담배에 존재하는 미생물의 증식 등으로 대별되는데 이

를 종합하면 후숙 초기에는 순전히 화학적 요인이나 후숙이 진행됨에 따라 잎담배의 환경이 미생물의 영양을 위해 보다 좋은 환경으로 바뀌게 되어 미생물이 급격히 증식하게 되고 또한 제변화가 수반된다. 미생물 작용에 의한 변화를 뒷받침하기 위한 연구로서 연차적으로 잎담배에 서식하는 미생물군락의 변화를 세균, 효모, 곰팡이로 나누어서 조사한 바에 의하면(7) 세균의 경우 후숙이 진행됨에 따라 개체군 수가 증가하며 그 주종을 이루는 종도 변화한다.

담배 제조 과정에서 산출되는 부산물중에는 이분이 상당량을 차지하며 이것이 폐기되고 있는 실정이므로 이를 이용하여 판상염으로 제조, 절각후 담배 원료로 재사용 하고저 하는 연구와 이분중에서 유용 성분을 분리하여 사용하는 연구가 진행되고 있다. 이분중에는 미생물이 생육하기에 적합한 영양원을 포함하고 있으며(표 1) pH도 5~7정도 이므로 이를 기질로하여 효모에 의하여 생성된 향을 담배 제조과정의 필수 여건인 1차 casing, toast casing, 최종 top flavor 등의 일부에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Composition of tobacco powder used

Contents	%
Total nitrogen	1.4
Nicotine	1.1
Total sugar	9.3
Reducing sugar	5.2
Crude fiber	10.9
Ether extract	9.2
Mn	0.022
Fe	0.14
Zn	0.007
Cu	0.002
K	0.098
Na	0.085

선진국에서는 산업폐기물을 미생물의 전환에 의하여 활용하고자 하는 연구가 이미 보고되어 있으며 따라서 향료 생산을 위한 미생물 이용의 전망이 밝다(2,4,9).

Vedamuthu(14)는 발효식품의 향은 미생물에 의하여 상당히 증가 또는 생성 된다고 하였으며, 木佐木(11)은 *Aspergillus*속과 *Rhizopus*속을  $\beta$ -ionon에 배양하여 향료를 생산하였다.

본 연구에서는 이분 활용 및 효모에 의한 발효향의 생산을 위한 기초 연구로 이분을 기질로 하여 생육이 양호한 효모를 분리하고 그중 바람직한 향을 생산하는 균주를 선별하여 동정하였다. 그리고 향의 특성을 보다 좋게하는 발효조건 및 생성된 향의 관능적 특성과 최소감량(threshold)을 조사하여 담배 향료로서의 적용 가능성을 연구 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 균주의 분리 및 선별.

효모를 분리하기 위하여 잎담배, 제롬담배, 부산물, 야채류, 폐수, 토양 등에서 수집한 시료 각각 1g 혹은 1ml를 곰팡이 생육을 억제하기 위하여 0.25% sodium propionate를 첨가한 yeast malt broth에 혼합 후 25°C에서 72시간 진탕 배양하고  $\frac{1}{10} \sim \frac{1}{100}$ 로 희석하여 같은 조건의 plate에 옮겨 단균락이 얻어질 때까지 계대배양 하였다.

그리고 우수균주의 선별을 위하여 사면배지로 부터 1 loop의 배양균을 따서 10% tobacco extract(+ glucose 0.5%) broth에 접종하여 25°C에서 72시간 진탕배양후 그 생장도와 관능적 특성이 우수한 3균주를 선별하였다.

### 2. 배 지(8, 15)

1. 동정, 배양, 계대용 배지  
Y. M. broth(Difco Lab.)
2. Colony관찰 배지  
Bacto yeast morphology agar
3. 생장특성 배지.  
Glucose-malt extract peptone agar(or broth)
4. 포자 형성 배지.  
Gorodkova agar, acetate agar
5. Slide 배양 배지.  
Corn meal agar
6. 탄소원, 질소원 동화배지.  
Bacto yeast morphology agar carbon base (nitrogen base)
7. 당 발효 배지.  
Fermentation basal medium
8. Tobacco extract broth  
100g의 이분을 1l의 물에 혼합하여 15 lb, 121°C에서 30분간 추출한후 gauze로 여과하여 다시 1l 가 될때까지 물을 첨가하고 glucose 0.5%를 첨가 함.
9. 그 밖의 생리적 실험.
  - a) Growth on vitamin-free medium  
Morphology agar minus vitamin complex
  - b) Growth on medium of high osmotic pressure

50%, 60% (W/W) Glucose-yeast extract agar

Basal medium: sodium chloride:1% (W/V)  
increment up to 20% (W/V)

- c) Acid production  
0.5% Yeast extract+glucose 5%+calcium carbonate 0.5%+agar 2%
- d) Production of extracellular amyloid compounds  
Glucose 2%+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%+MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1%+agar 2% (pH 4.5)
- e) Hydrolysis of urea  
Christensen's urea agar
- f) Fat splitting  
Gorodkova agar + chalk 0.1%+fat (0.5ml per plate)
- g) Pigment formation  
Sucrose 4%+2% peptone+0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+0.05% MgSO<sub>4</sub>·8H<sub>2</sub>O+1% autolysate+2% agar+1% ferric ammonium citrate(5% solution)
- h) Ester production  
Y. M. agar
- i) Gelatin liquefaction  
Malt extract gelatin

### 3. 동 정(同定)

Lodder(8)의 방법에 따라 상기한 배지를 사용하여 효모의 형태, 성장 및 생리적 특성을 조사한 후, 속(genus)까지 동정하였다(1,10,15).

사진촬영은 Nikon microflex HFM-35 A 현미경을 사용하여 1,000배로 촬영하였다.

### 4. 접종 및 발효방법.

효모를 2-3회 계대배양하여 활성화 시킨 다음 1 loop의 배양균을 따서 10ml의 멸균증류수에 희석한 후, 그 현탁액 1 loop(약 10<sup>6</sup> cell/ml)를 inoculum 으로 사용하였다.

발효 방법은 500ml Erlenmyer flask에 10% tobacco extract(+glucose 0.5%) broth (pH 5.0) 200ml 넣어 효모를 접종한 후 Gyrotory water bath shaker(model G-76. N. B. S. Co)에서 196rpm, 25°C로 30-60 시간 진탕 배양하였다.

### 5. 생장곡선 측정.

Morphology broth와 tobacco extract broth에서 배양, 증식된 효모의 수는 haemocytometer로 측정하였다.

### 6. 발효액의 추출, 분획 및 농축.

발효액은 원심분리기(Sorvall RC2-B)를 사용하여 7,000rpm으로 20분 동안 원심분리한 다음 상등액을 취하였으며, 산성, 중성, 염기성 분획의 구분은 그림 1과 같이 하였고, 향의 농축은 rotary evaporator(Rotavapor R 110 Büchi)를 사용하여 20°C, 120 rpm으로 하였다.

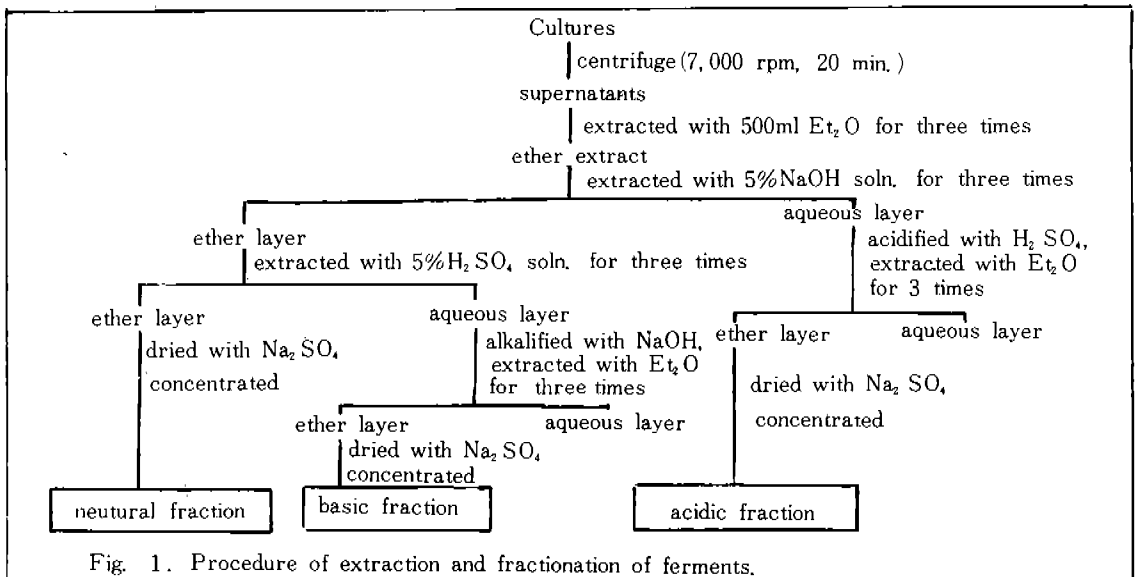


Fig. 1. Procedure of extraction and fractionation of ferments.

## 7. 관능검사 및 최소 감량치 측정.

생성된 향의 관능검사 및 최소 감량치를 구하기 위하여 panel 10명을 선정하여 Henning(5)의 smell prism에 의하여 약향(spicy), 화향(fragrant), 과향(ethreal), 수지(resinous), 부패취(putrid), 초취(burned)의 6개 기본취로 분류하여 panel test를 하였다.

향의 농축도 및 강도를 알기 위하여 최소 감량치를 측정하였는데 농축된 향을 EtOH로 희석하여 smelling paper에 흡착시킨 후, EtOH를 대기중에서 휘발시킨 다음 panel중 50% 이상의 인원이 향이 남아있다고 판정할 때까지 희석배율을 높였다.

## 결과 및 고찰.

자연상태의 67곳으로부터 시료를 수집하여 효모 분리배지에서 배양한 결과, 그중 34곳의 시료에서 각각 1-3종류의 colony가 얻어졌고 여기에서 다시 41주의 효모가 순수분리 되었다.

이들을 tobacco extract농도, glucose의 농도 및 성장기간을 다르게 하여 그 성장도와 생성되는 향의 특성을 조사하여 지속적으로 좋은 결과를 나타낸 균주를 1차로 선별한 다음 그 중 유사한 향을 가지는 것을 제외하고 향특성이 좋은 Yo II, M4-1, M19-1, 3균주를 최종 선별하였다.

담배 추출물과 glucose 농도를 달리하여 tobacco extract broth를 준비한 후 효모의 성장도와 생성된 향특성의 비교시, 10% tobacco extract(+glucose 0.5%)에서 좋은 결과가 얻어졌으며, 일반적으로 old culture 일때 보다는 young culture 일때 향특성이 양호하였다.

Tobacco extract broth(T. E. B)와 morphology broth(M. B)에서의 성장 곡선을 보면 T. E. B. 에서는 6시간 정도 늦게 대수 성장기에 도달하여 18-24시간 대수생장이 지속되었다. 그리고 그림2에서 M19-1이 M4-1이나 Yo II에 비하여 12시간 정도 성장속도가 늦은 것으로 나타났다.

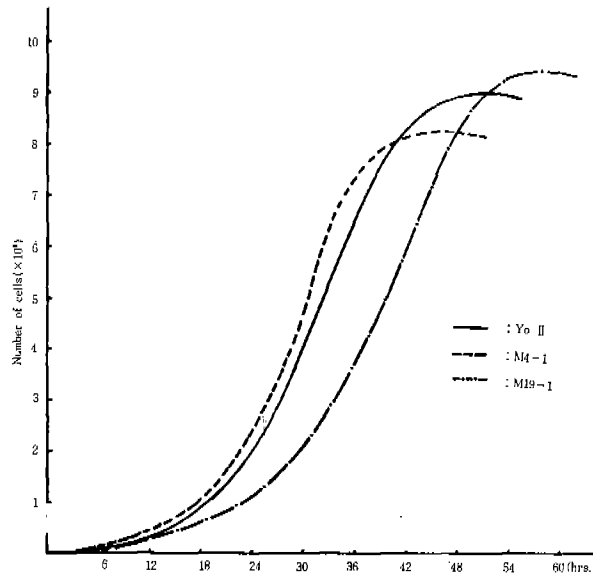


Fig. 2. Growth curves in the tobacco extract broth

효모성장 정도에 따른 발효향의 특성은 stationary phase에 들어가기 직전까지는 old culture 보다 관능검사 결과가 좋게 나타났다. 그러므로 대수성장기가 지나면 향의 강도가 약간 커지기는 하지만 효모의 대사작용에 의하여 생성된 2차 대사산물 및 중간 대사산물에 의하여 잡취도 강해지기 때문에 주된 향이 잘 나타나지 않는 것으로 생각된다.

그림 3에서 T. E. B. 에서의 발효과정을 통한 pH 변화를 보면 3균주가 각각 pH변화 양상은 다르지 발효가 거의 끝날 무렵에는 pH 7.3정도로 중성을 지하였다. 이것은 발효산물을 에틸로 추출하여 산중성, 염기성별로 나누었을 때 중성분획에서 원래 향기성분이 강하게 나타난다는 사실을 뒷받침해주었다.

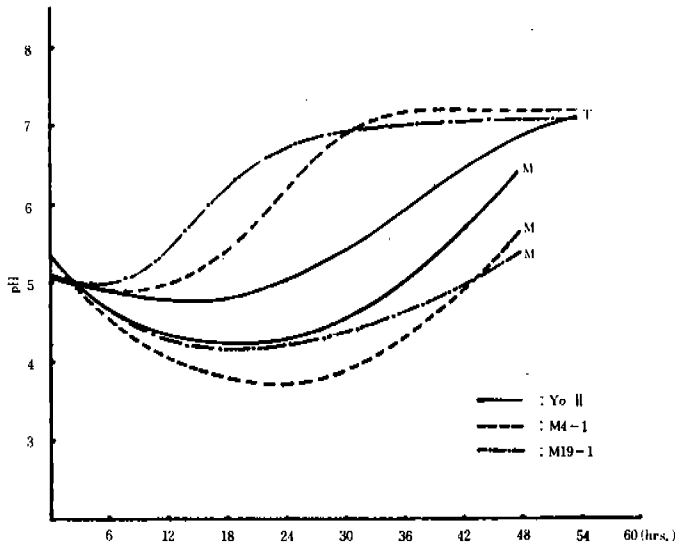


Fig. 3. pH changes in tobacco extract broth(T) and morphology broth(M).

M. B.에서의 pH 변화를 보면 3균주가 비슷하게 20여시간까지는 pH가 3.5-4.0까지 감소하다가 대수생장기가 유지되면서 pH가 다시 중성쪽으로 증가하는 것으로 나타났다.

최종 선정된 우수균주에 대하여 Lodder(8)의 분류 key에 의한 실험결과(표 2, 3, 4)로 Yo II는 *Hansenula cifferri*, M4-1은 *Pichia acaciae*, M19-1은 *Candida tropicalis*로 각각 동정 되었다.

Table 2. Cultural and physiological characteristics

Characteristics	YO II	M 4-1	M 19-1
1. Splitting of arbutin	+	+	-
2. Growth at 37°C	-	-	+
3. Growth on vitamin-free medium	+	-	±
4. Growth on medium of high osmotic pressure (60% glucose)	+	+	-
5. Acid production	++	+	±
6. Production of extra cellular amyloid compounds	-	-	-
7. Urease	+	-	+
8. Fat splitting	-	-	-
9. Pigment formation	-	-	-
10. Ester production	+	-	-
11. Gelatin liquefaction	-	-	-
12. NaCl tolerance (%)	12	8	12
13. pH range for growth	3.0-9.0	3.0-7.0	3.0-8.0

14. Assimilation of nitrogenous compounds			
KNO <sub>3</sub>	++	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	++	-	+
NaNO <sub>2</sub>	++	-	-
Lysine	++	-	+
Urea	+	-	+
Aniline	-	-	-
Aspartic acid	++	-	+

+ : Positive      ± : Usually positive, occasionally negative      - : Negative

Table 3. Morphological characteristics

Isolates Characteristics	YO II	M 4-1	M 19-1
Source	polluted water	One Sucker (cigar tobacco)	soil
Size (μm)	1-2 × 2-4	1-1.5 × 2-2.5	3-5 × 4-6
Shape	globose, ovoidal in chains or clusters	spherical short oval in pair, single	ovoid, globose
Budding	unipolar	multipolar	unipolar
Colony	yellowish brown soft, dull opaque, dry	yellowish white granular mucoid, round glistening	white to cream colored dull, smooth hairy
Mycelium	pseudomycelium	pseudomycelium	true mycelium pseudomycelium
Ascospore	+	+	-
Broth culture	pellicle	sediment	sediment ring

효모의 성장 및 발효를 위한 최적조건을 찾기 위하여 pH 별, 당 종류별로 기질에 첨가하여 48시간 발효시킨 다음 발효산물의 pH 및 관능 검사결과, 대부분 pH 5.0-6.0에서 향의 생성이 양호했으며 당 종류로는 glucose를 첨가하는 것이 가장 효과적이었다.

상기 조건으로 균주를 T. E. B. 에 배양하여 Henning (5)의 smell prism에 의하여 6개의 기본취로 나누어 관능검사를 한 결과, Yo II는 약향(spicy), M4-1은

약향 및 과향(spicy + ethreal), M19-1은 과향(ethreal)이었으며, 최소 감량치는 약 50ppm이었다.

본 실험에서 폐기물인 부산물을 즉 이분을 기질로 생성된 향료는 제품담배의 향료로 사용할 수 있을 것으로 평가되며, 특히 특수담배(pipe, cigar, chewing tobacco)의 다양한 외향 부여로 제품의 품질향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Fermentation and assimilation of carbon compounds

	Yo II	M4-1	M19-1		Yo II	M4-1	M19-1
Fermentation							
glucose	+	+	+	melibiose	-	-	-
galactose	+	-	+	cellobiose	+	+	-
sucrose	+	-	+	trehalose	+	-	+
maltose	+	-	+	melezitose	+	-	+
lactose	-	-	-	inulin	-	-	-
raffinose	+	-	-	soluble starch	-	-	-
Assimilation of C. Compds.							
glucose	+	+	+	ribose	-	+	-
galactose	+	+	+	rhamnose	±	+	-
sorbitose	-	-	-	ethanol	+	+	+
sucrose	+	-	+	sorbitol	+	+	-
maltose	+	+	+	erythritol	+	+	-
cellobiose	±	+	+	ribitol	-	+	+
trehalose	+	+	+	dulcitol	-	-	-
lactose	-	-	-	D-mannitol	+	+	+
melibiose	-	-	-	salicin	+	+	-
raffinose	-	-	-	DL-lactic acid	+	-	+
melezitose	+	-	+	succinic acid	+	+	+
inulin	-	-	-	citric acid	+	+	+
starch	±	+	-	inositol	-	-	-
xylose	+	++	+	glucono-δ-lactone	-	-	+
arabinose	-	+	-				

## 결 론

향을 생성하는 균주의 선별, 동정, 최적생장 조건 및 향의 관능적 특성을 조사한 결과는 다음과 같다.

- 67곳으로 부터 41종의 효모를 순수분리하여 그 중 향특성이 양호한 Yo II, M4-1, M19-1을 선별하였다.
- Yo II, M4-1, M19-1을 동정한 결과, *Hansenula ciferrii*, *Pichia acaciae*, *Candida tropicalis*로 각각 동정 되었다.
- 선별된 효모는 pH 5~6, 온도 25-30°C, 10%이분 추출물에 glucose 0.5%를 첨가한 배지에서 생장이 양호 하였다.
- 생성향의 관능적 특성은 M4-1은 약향(spicy), M4-1은 약향과 과향(spicy+ethreal), M19-1은 과향(spicy)이었으며 최소 감량치는 약 50ppm 이었다.

## 인 용 문 헌

- Dakin, J. C. and P. M. Day. *J. Appl. Bact.* 21 : 94-95 (1958).
- Demole, E. P. U. S. Patent No. 4,092,989 (1978).
- Frenkenburg, W. G. *Adv. in Enzymol.* VI : 309 (1946).
- 蟹沢小好, 醸協誌 33 : 328-340 (1975).
- 장건형, "식품의 기호성과 관능검사" 향문사, pp 55-64 (1975).
- Kaminski, E., S. Stawicki, and E. Wasovicz. *Appl. Microbiol.* 27 (6) : 1001 (1974).
- Koiwai, A., T. Matsuto, and K. Nishida. *Tob. Sci.* 15 : 103-105 (1971).
- Lodder, J. "The Yeast", North-Holland Publishing Co. Amsterdam, 2nd ed. pp. 1-33 (1971).

9. Malan, J. D. and J. C. Thirion. Offenlegungs-  
schrift 2, 713, 865 (1977).
10. Mark, E. M. and L. S. McClung. *J. Bacteri-*  
*ol.* 40 : 395-397 (1940).
11. 木佐木卓郎. 昭53-12498 일본국 특허청 (1978).
12. Robert, D. L. U. S. Patent No. 3, 780, 743  
(1973).
13. Takane, F. 専賣中研報 pp. 118-119 (1976).
14. Vedamuthu, E. R. Symposium : Microbial pro-  
duction of flavor-fragrance material, pp187-  
202 (1978).
15. Wickerham, K. J. and J. P. Van der Walt.  
"Taxonomy of yeast", U. S. Dept. Agr. Tech.  
Bull. No. 1029 : 267-270, 467-468, 572-675,  
and 1059-1257 (1972).