

## 황색종 잎담배의 발효숙성 촉진에 관한 종합적 연구

배 호 원

(중앙전매기술연구소)

(1969. 10. 20. 수리)

### A Comprehensive Study on the Forced Aging of Flue-cured Tobacco-Leaves

H. W. Bae

(Central Research Institute of Korean Monopoly)

#### Summary

The process of the forced aging of flue-cured tobacco leaves were studied extensively from various scientific points of view. The Flue-cured tobacco leaves were inoculated and fermented with nicotine resistant *Hansenula* yeast, or the leaves were subjected under simple forced aging. The above two processes of forced aging were studied from the summarized points of microbiology, physics, chemistry, and biochemistry, and the resulted products were compared in their physical, chemical and biochemical quality determining factors with that of raw material tobacco leaves (dried-tobacco leaves) and 2 years aged high quality tobacco leaves. The summary results were as follows.

1) The Korean flue-cured tobacco leaves, were forcedly aged under the basic optimum aging condition, temperature 40°C, moisture contents 18%, relative humidity 74%. It was found that this aging condition was the best in bringing the quality of forcedly aged tobacco leaves to the utmost state.

2) Under this optimum temperature and moisture condition of forced aging in about 20 days the forcedly aged tobacco leaves both with yeast inoculation and without yeast inoculation showed the equivalent tobacco qualities comparable with that of more than 2 years aged tobacco leaves.

3) The forcedly aged tobacco leaves both with and without yeast inoculation under 40°C temperature and 74% relative humidity achieved the necessary quality determining physical and chemical changes in about 20 days.

4) The microbial changes during the forced aging were as follows. The population of yeasts and bacteria increased until to 15 days of aging, then decreased thereafter. Whereas the molds grew continuously until the end of fermentation.

5) The tobacco quality determining physico-chemico-properties of yeast inoculated aged and simple forcedly aged tobacco leaves, progressed as the follows in time. As the forced aging progresses, swelling and combustibility properties were improved. The pH, total reducing materials, total sugars, alkaloids contents decreased. The contents of organic and

ether extractable materials increased. The total nitrogen, protein, crude fiber, ash contents showed no changes. The color properties, excitation purity, luminance, main wave length, showed equivalent changes comparable with that of 2 years aged tobacco leaves.

6) The changes in chemical components in yeast treated and simple forcedly aged tobacco leaves during 15~20 days of forced aging were as follows. The following chemical components decreased as the aging. Sugars—sucrose, rhamnose, glucose. Pigments—chlorophyll, carotenes, xanthophyll and violaxanthine. Polyphenols—rutin, chlorogenic acid, caffeic acid. Organic acids—iso-butylic, crotonic, caprylic, galacturonic, tartaric, succinic, citric acid. Alkaloids—nicotine, nornicotine. The following components increased as the forced aging progressed. Sugars—fructose, maltose, raffinose. Amino acids—proline, cystine. Organic acids—formic, acetic, propionic, n-butyric, iso-valeric, n-valeric, malic, oxalic, malonic,  $\alpha$ -ketoglutaric, fumaric, glutaric acid.

7) During the forced aging of tobacco leaves the oxygen-uptake decreased gradually. The enzyme activities of polyphenol oxidase,  $\beta$ -amylase  $\alpha$ -amylase decreased gradually. The activities of the enzymes, catalase, and invertase increased once then decreased at the later stage.

## · 머릿말

잎담배는 일반적으로 2~3년간 저장 숙성시킴으로서 향기와 맛이 순화된다. 그러나 이와같이 장기숙성을 시키자면 시설과 경비가 많이 소요되므로 잎담배를 되도록이면 인공적으로 조기숙성시켜 사용코져 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 잎담배의 인공발효에 대한 연구는 Koller<sup>1)</sup>가 처음으로 시작하였으며, 그는 이미 1858년에 효모를 첨가하는 잎담배의 인공발효시험을 하였다. 그후 Schlösing<sup>2)</sup>, Behrens 등<sup>3)</sup>은 잎담배의 퇴적발효에 곰팡이 및 세균이 관여하고 있음을 밝힘으로서 잎담배숙성에 미생물이 주역활을 하고 있다는 미생물학설이 나오게 되고 이어서 Mckinsty 등<sup>4)</sup>의 cigar 제조용 잎담배의 전처리인 퇴적발효에 관여하는 미생물의 생태학적 연구, Köning<sup>5)</sup>의 잎담배 발효에 관여하는 효모균의 동정, Mosca<sup>6)</sup>, Schmidt<sup>7)</sup>, Joergensen 등<sup>8)</sup>의 잎담배발효에 관여하는 세균에 대한 연구, Johnson<sup>9)</sup>의 잎담배 발효미생물에 관한 연구, Naghski<sup>10)</sup> 등의 발효중의 세균수와 시료중의 nicotine 및 휘발성 phenol 화합물에 관한 연구 등이 이루어졌다. 그러나 1900년대 부터는 차차 잎담배의 숙성 및 발효의 연구가 효소학적인 면과 화학적인 면에서 활발히 이루어져서 Loew<sup>11)</sup>는 처음으로 잎담배에서 oxidase, peroxidase, catalase 등을 발견하여 담배잎이 말라서 수분함량이 적을 때는 잎담배의 숙성은 주로 효소작용에 의한다고 주장하였고 그후 Kolenev<sup>12)</sup>는 무균상태에서의 잎담배발효연구를 하여 다같이 잎담배 인공숙성의 효소설

을 제창하였다.

한편 Smirnov<sup>13,14)</sup>, Kissling<sup>15)</sup>, Jensen<sup>16,17)</sup> 등은 잎담배숙성과정에 있어서의 산소흡수 탄산가스 발생에 관하여 연구 하였고 Petrenko<sup>18)</sup>, Volgnunov<sup>19)</sup> 등은 발효지수로서 polyphenol oxidase의 변화양상을 측정하는 방법을 고안하였다. 또한 Boekhout 등<sup>20)</sup>은 잎담배를 100°C로 열처리하여 미생물을 죽이고 효소를 불활성화시켜도 산소흡수 및 탄산가스 발생능력이 상실되지 않는 사실을 밝혀 잎담배의 화학적인 발효기작을 가정함으로써 잎담배인공숙성의 화학설을 제창하게 되었다. 담배의 발효 및 숙성에 관한 연구는 위 세가지 학설 중의 어떤 특정한 연구분야만으로는 그 기작을 해명할 수 없으며 모든 분야의 종합적인 연구결과로서 잎담배의 참다운 발효기작이 구명될 것이다. 따라서 1935년 이후에는 잎담배의 미생물적 발효와 생화학적 및 화학적 숙성의 개념을 동일시 하게 되어 그 원인에 대한 가설의 정립보다는 발효에 따른 화학적 물리적 변화를 추구함으로써 인공발효법의 제반 조건을 확립하는 연구가 진행되어 왔던 것이다. 즉 Dixon 등<sup>21)</sup>의 담배 숙성 과정에 대한 연구, Darkis 등<sup>22)</sup>의 잎담배숙성중 화학변화에 관한 연구, Rollin<sup>23)</sup>의 잎담배인공발효법, 빅<sup>24)</sup> 등의 한국담배의 발효 기본조건에 관한 조사, Noguchi 등<sup>25)</sup>의 잎담배 숙성속진의 화학적변화에 관한연구, Tisnes<sup>26)</sup>의 인공발효에 따른 잎담배중의 아미노산의 변화, Enders<sup>27)</sup> 및 Wada<sup>28)</sup> 등에 의한 발효중 미생물에 의한 alkaloid 특히 nicotine의 분해에

관한 연구, Steadman<sup>29)</sup>의 polyphenol에 관한 연구, Frankenburg 등<sup>30)</sup>, Remenschneider<sup>31)</sup>, Venratarao 등<sup>32)</sup>에 의한 발효과정중 비휘발성유기산의 변동에 관한 보고, Sabetay<sup>33)</sup>의 휘발성유기산의 검색, Giovanozzi 등<sup>35)</sup> 및 Pillipp<sup>34)</sup>의 발효에 있어서 산소흡수계수에 대한 연구, Pyriki<sup>36)</sup>, Weybrew<sup>37)</sup>, Toyoda<sup>38)</sup> 등의 잎담배 재 건조 특히 온도, 수분함량에 관한 연구, Alcarae-Mira<sup>39)</sup>의 미생물 및 산화 ethylene을 사용한 화학적 숙성 촉진에 관한 연구 Ilijin<sup>40)</sup> 등에 의한 전기발효법, Grob<sup>41)</sup>에 의한 자외선, 적외선 및 고주파등을 이용한 물리적인 처리법 Schmuck 등<sup>42)</sup>의 전환원성물질량 및 전탄수화물질량에 의한 잎담배의 품질평가, Brückner<sup>43)</sup> 및 Pyriki<sup>44)</sup>의 잎담배 품질측정법의 창안 등을 들 수 있다. 특히 최근에 이르러 Frankenburg<sup>45)</sup>와 Giovanozzi<sup>46)</sup>의 잎담배 발효숙성에 관한 2대 종설은 그간의 연구를 총망라한 감이 있다.

현재 한국에 있어서 담배는 국가재정수입에 중요한 역할을 하고 있으나 잎담배원료의 생산은 수요에 따르지 못하고 있는 실정이며, 더욱이 잎담배를 저장숙성시킬만한 여유는 없다. 따라서 잎담배의 인공발효숙성에 관한 연구는 시급하고도 중요한 것이다.

필자는 이미 이 방면 연구의 일부로서 잎담배에 대한 건조, 미생물 및 이들의 인공발효에의 이용, 화학성분 및 효소의 활성도에 관한 부분적인 연구결과<sup>(47,48,49,50)</sup>를 발표한바 있으나 한국에 있어서 이 방면의 연구보고가 드물고 현재까지의 부분적인 연구결과 만으로는 잎담배 인공발효숙성에 관한 종합적인 문제의 규명은 이루어지기 어렵다. 그리하여 잎담배인공발효숙성을 미처리, 효모처리에 의한 인공발효숙성, 단순한 인공숙성 및 2년저장숙성의 4 경우에 대하여 미생물학, 물리학, 화학 및 생화학적인 면에서 그 변화 과정을 연구하여 종합적인 견지에서 담배의 인공숙성에 대해 연구한바 이에 몇가지 유익한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 잎담배의 채취

실험 재료인 엽연초는 충남 전의\*에서 정상적으로 생육, 수확, 건조된 1966, 1967, 1968년산 *Nicotiana tabacum var. virginica*의 황색종 Yellow

special A 증 비교적 품질이 균일한 것을 채취하여 중류 (midrib)을 제거하고 수분이 12%되게끔 재 건조처리하였다.

### 2. 잎담배의 발효숙성처리

#### a. 효모의 선택

필자<sup>51)</sup>와 김<sup>52)</sup> 등이 수집한 53주의 효모를 필자가 고안한 malt extract 배지\*\*에 30°C, 48시간 배양한 것을 다시 잎담배추출액\*\*\*에 접종하여 30°C 및 40°C에서 24시간 정치배양하고 고온에서 생육상태 및 향기가 좋은 15주를 선발하였다. 이들을 각기 잎담배추출액에 48시간 통기배양한 다음 원심분리(5000 r.p.m)하여 대량의 효모를 얻었다. 이들 효모 1g씩을 살균수 1l에 현탁한 것을 잎담배에 다시 분무, 접종시켜 발효를 시키고 각 효모별 처리잎담배를 관능 검사에 의하여 그 숙성효과를 조사한 바 Table 1과 같이 생육 및 향취가 가장 우수한 *Hansenula angusta y-512*를 본 실험에 사용할 효모로 선택하였다.

#### b. 발효조건 결정 및 숙성처리

발효온도는 *Hansenula angusta y-512*의 생육적온이며 다른 곰팡이의 번식을 피할 수 있고 잎담배 발효숙성에 적합하다고 생각되는 40°C를 골랐다. 습도는 선택, 기타 물질유지에 지장을 주지 않는 평형함수율을 조사해본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 황색종에서 최대한계 수분량인 18%, 즉 습도가 74%가 되는 조건을 골랐다. 잎담배는 30kg 당 *Hansenula angusta y-512*의 살균수 현탁액 1.5l (5g/l)을 분무한 후 발효실에 넣어서 온도 40±0.5°C, 습도 74±0.5%로 해서 수분 18%가 되게 하여 30일간 발효숙성시켰다.

#### c. 생균수의 측정

희석법<sup>53)</sup>에 준하여<sup>54,55)</sup> 발효숙성중인 잎담배 1g를 살균수 50ml에 넣어 5~10분간 혼든 다음 Table 3과 같은 배양조건에서 생균수를 측정하였다.

### 3. 시료의 조제

효모를 첨가한 것과 첨가하지 않는 발효숙성 잎담배를 5일 간격을 두고 7차에 걸쳐 분석용 시료를 채취하였다. 이 시료를 진공냉동건조기로 20mm Hg, 40°C에서 6시간 건조하고, 일부는 16 mesh로 분쇄한 다음 이것들을 polyethylene 병에 넣어 밀봉하고 5°C에서 보관하였다.

시료구분은 다음과 같이 약기한다.

\* 전의는 잎담배생산에 있어서 생태적으로나 품질 및 수량면에서 중위에 속하는 지대임.

\*\* malt extract : 20g pepton 1g dextrose 20g agar 20g 증류수 1l

\*\*\* 잎담배 분말 20g을 증류수 1l로 60°C에서 2시간 추출함.

Table 1. Growth and aroma of yeasts at 30 and 40°C.

yeast	growth		aroma		sensory test	
	30°C	40°C	30°C	40°C	score	grade
<i>Hansenula angusta</i> y-512	‡	‡	‡	‡	120/20	1
<i>Hansenula anomala</i> y-515	‡	‡	+	+	123/20	4
<i>Hansenula fabianii</i> (nrri-y-2167)	‡	‡	‡	+	128/20	2
<i>Hansenula fabianii</i> (nrri-y-2168)	‡	‡	+	+	144/20	8
<i>Hansenula subpelliculosa</i> (nrri-y-1974)	‡	‡	‡	+	140/20	7
<i>Hansenula asturnus</i> y-514	‡	‡	‡	‡	136/20	6
<i>Candida lypolytica</i> y-133	‡	‡	‡	‡	148/20	9
<i>Candida pseudotropicalis</i> y-134	‡	‡	—	—	170/20	15
<i>Saccharomyces corcanus</i> (type-1)	‡	‡	‡	‡	125/20	3
<i>Saccharomyces sake</i> (29)	‡	‡	+	+	160/20	13
<i>Saccharomyces sake</i> (27)	‡	‡	+	+	157/20	12
<i>Zygosaccharomyces ashbyii</i> (nrri-y-1598)	‡	‡	—	+	164/20	14
<i>Tolurasporea fermentati</i>	‡	‡	‡	+	130/20	5
<i>Tolula utilis</i> y-200	‡	‡	+	+	150/20	10
<i>Tolura utilis henneberg</i>	‡	‡	‡	‡	154/20	11

— bad    + ordinary    ‡ good    ‡ highest

Table 2. Equilibrium moisture content at different temperature and relative humidity.

grade	temp. R.H.	30°C			40°C		
		70%	75%	80%	70%	75%	80%
top 5		16.6	19.1	23.0	15.8	18.3	22.4
leaf 1		16.9	19.3	23.3	16.1	18.4	22.7
leaf 3		16.5	19.0	23.1	15.8	18.2	22.3
cutter 1		17.1	19.6	23.5	16.3	18.6	22.8
cutter 3		16.8	19.2	23.3	15.9	18.2	22.5
lug 5		16.5	18.8	22.8	15.6	18.0	22.0

Table 3. Composition of the selective medium and culture.

aerobic bacteria		mold		yeast	
T.G.Y. medium		medium		medium	
yeast ext.	5.0g	NaNO <sub>3</sub>	3.0g	malt ext.	20.0g
tryptone	5.0g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0g	peptone	1.0g
glucose	1.0g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g	dextrose	20.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0g	KCl	0.5g	agar	20.0g
agar	20.0g	sucrose	20.0g	tobacco ext.	(1.5%)
tobacco ext.	(1.5%)	agar	20.0g	dist. water	1l
dist. water	1l	tobacco ext.	(1.5%)	pH	5.5
pH	7.0	pH	5.0		
35~37°C 2~7days in aerobic condition		25~30°C 3~7days in aerobic condition		30~35°C 3~7days in aerobic condition	

미처리구(CURED)——건조잎담배구(Cured and not aged tobacco leaves)

속성구(FORCED)——효모무첨가 인공속성잎담배구(Forcely aged tobacco leaves without yeast inoculation)

효모구(YEAST)——효모첨가 인공속성잎담배구(Forcely aged tobacco leaves with yeast inoculation)

속성구(AGED)——저장속성 잎담배구(naturally aged tobacco leaves)

#### 4. 잎담배의 이화학적 분석

##### a. 물리적 실험

###### (1) 연소성

Izawa 등<sup>56)</sup>의 방법에 준하여 0.9mm 폭으로 절각된 잎담배시료를 수분 12%로 조화하여 권주 25.5mm 전총량 1.0±0.02g 되게 cigarette를 만들어 기리 30mm를 자연연소시켜 time swich로 시간을 측정한다.

###### (2) 팽승성

Kobata 등<sup>56)</sup>의 방법에 준하여 0.9mm 폭으로 절각된 잎담배시료 15g를 수분 12%로 조화하여 초자관이 붙은 고무 주머니에 넣어 팽승성 측정장치에서 수온 20°C에 넣고 고무주머니의 압력을 약 660mg Hg로 manometer를 조절하여 삽입전후의 수위의 차를 cathometer로 측정하여 각조의 체적을 계산한다.

###### (3) 선택 측정법

###### 가. 시료의 조제

잎담배에서 특히 선택과 기타 성상이 고른 잎 5매를 골라서 수분함량이 15±1%로 하여 잎의 중앙부위에서 중륵의 좌측은 속성구, 우측은 효모구로 하여 전술한 발효속성조건으로 처리한 것을 시료로 하였다.

###### 나. 측정방법

색의 측정은 혼색실험에 의한 측정방법<sup>57)</sup>을 채택하였다. 즉 spectronic 20 colorimeter를 사용하여 trichromatic coefficient computing form of luminant C로 분광반사율을 기록계산하여 색의 좌표를 구하고 명도, 자극순도, 주재파장을 산출하였다.

##### b. 화학적 분석

###### (1) 일반성분의 분석

pH, 평형함수율, 전질소, 단백질, 아미이드태질소, 질산태질소, 암모니아태질소, 총유기산, 조섬유소, 회분, 에테르추출물, 석유에테르추출물, 전수지, 알카리도 등 일반적인 화학성분 분석은 상

법<sup>58,59,60)</sup>에 의하여었다.

###### (2) 전환원성 물질분석

Shmuck<sup>61)</sup>의 당정량법에 따라 잎담배분말시료 10g를 50°C, 300ml의 물로 추출, 이를 가수분해하여 Fehling 용액 A,B를 각각 20ml 넣고 3분간 가열하여 생긴 Cu<sub>2</sub>O 침전을 1/10N-KMnO<sub>4</sub> 표준용액으로 적정, 시료 1g 당 %로 표시하였다.

###### (3) 당분분석

###### (가) 환원당

상법<sup>58)</sup>에 의하여 추출한 분석시료 일정량을 취하여 식초산납을 가하여 phenol성 물질과 아미노산 및 중금속 등 기타 물질을 제거한 후 Cu<sub>2</sub>O 침전을 Bertland 법<sup>58)</sup>에 의하여 적정 계산하여 환원당으로 했다.

###### (나) 전당

공시액 일정량을 취해서 상법<sup>60)</sup>에 따라 식초산납 처리후 25%HCl로 수욕상에서 2~3시간 가수분해한 후 적정, 계산하여 전당으로 했다.

###### (4) 잎담배 색소의 column chromatography 분리

Winterstain<sup>6)</sup>의 방법에 준하여 잎담배 분말시료 각 0.5g을 삼각후라스크에 넣어 benzin:benzen:methanol (9:1:3)의 혼합용매 65ml를 주입하여 어두운 곳에 실온에서 약 1시간 방치한 후 여과해서 얻은 여액을 물로 세척한 다음 methanol을 증발 제거시켜 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수하여 시료용액으로 하였다. benzin을 사용하여 잘 건조된 활성 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, lactose를 column(1×30cm)에 순차적으로 4, 6, 8cm의 높이로 충전한 후 시료용액을 흡착시킨 다음 benzin:benzen (4:1v/v) 혼합용매로 전개시켰다. 전개가 진척되면 column의 흡착제를 색소층 별로 분리 하였다. 이들을 다시 methanol 1~2% 첨가한 benzen으로 용출하여 spectrophotometer로 470, 474, 485mμ의 파장에서 O.D.를 측정하여 Zechmeister<sup>(62)</sup>의 absorption coefficient를 사용하여 각 색소의 량을 계산하였다.

###### (5) 당당류의 정량

Snell & Snell<sup>(64)</sup>의 방법에 준하되 기타방법<sup>63, 64, 65, 66)</sup>을 참고하였다. 분말시료를 80% methanol로 1주야 추출후 수욕상에서 5ml 정도로 농축해서 음양이온이 혼합된 이온 교환수지(Ionen. Auscher V)를 충전시킨 column (0.8×10cm)을 1 drop/2 sec 정도의 유속으로 통과시키고 이어서 당 반응이 없을때까지 증류수로 씻어 농축하여 paper chromatography의 전개시료로 하였다. paper chromatography는 Toyo 여지 No. 50에 표준사

료\*와 나란히 시료를 spotting 하여 n-butanol: acetic acid: water (14;3;4)의 전개액을 사용하여 1차원 상승법으로 3회 전개하였다. 발색시약으로는 aniline phthalate solution을 spraying 하여 120°C에서 20분간 가열 발색시켜 발색부위를 오려서 물 25ml로 5회 되풀이 추출하여 2% anthrone reagent로 발색 Beckman D.U. spectrophotometer로 620m $\mu$  파장에서 O.D를 측정 정량하였다.

#### (6) Polyphenol 류의 정량

(가) Chlorogenic acid 및 caffeic acid의 정량  
Bulen<sup>69)</sup>과 Uritani<sup>70)</sup>의 방법에 준하여 잎담배 시료 5g에 96%의 ethanol를 가해서 1시간 끓여서 polyphenol oxidase을 불활성화 시킨 다음 물을 가해서 70%의 ethanol로 만들어 50~55°C에서 3회 추출했다. 이어 추출액은 10ml로 농축하여 이중 10ml를 Whatman 여지 No. 1에 spotting 하여 ethyl acetate: pyridine: water (2;1;2) 용매로 1차 전개시킨 다음 n-butanol: methanol: water (4:1:5) 전개용매를 사용하여 2차로 상승 16시간 전개시킨 것을 열풍으로 건조시켰다. 이것을 U.V. light에 의해 fluorescence를 갖는 성질과 Rf 값 등을 이용하여 chlorogenic acid, caffeic acid의 spot를 찾아 잘라서 물 10ml로 용출하여 얻은 액을 Beckman D.U. spectrophotometer로 320, 480m $\mu$  파장에서 각각 O.D.를 측정하여 계산하였다.

#### (나) Rutin의 정량

Akaike<sup>71)</sup>의 방법에 준하여 건조시료 2g를 microsoxhlet를 사용하여 무수 chloroform 60ml로 4시간 추출해서 색소와 수지를 제거하고 그 잔사에 다시 60ml의 무수 methanol을 가하여 microsoxhlet에서 6시간 추출하였다. 이 추출액을 100ml로 하여 이중 10ml를 conical flask에 옮겨 methanol을 증발시킨 다음 잔사에 다시 methanol 1.5ml을 가해 용해시키고 acetone 5ml을 가해 생긴 침전을 여과하고 다시 acetone을 첨가하여 10ml로 만들어 시료액으로 사용한다. 상기액 2ml에 solution A\*\* 4ml와 solution B\*\*\* 4ml를 가해 측정용으로 하여 Beckman D.U spectrophotometer를 사용하여 418m $\mu$  파장에서 O.D.를 측정 rutin량을 계산하였다. blank 용으로는 solution B 대신에 무수 acetone 4ml를 사용하였다.

#### (7) 아미노산의 정량

Automatic amino acid analyzer를 사용하여 Warik 등<sup>72)</sup>의 방법에 따라 조작하였다.

즉 분말시료 각 10g에 70% methanol 50ml을 가하여 하루밤 조용히 두어 추출한 다음 trichloroacetic acid로 단백질을 제거 Toyo 여지 No. 5B로 여과, 잔사를 70% methanol로 충분히 씻고 온수욕상에서 methanol을 제거한 다음 냉장 고중에서 냉각, 원심분리, 침전을 제거하고 여액을 농축하여 H<sup>+</sup> 이온 양이온 교환수지를 천천히 통과시켜 아미노산을 흡착시키고, 증류수로 ninhydrin 반응이 약간 나타날때까지 세척한 다음 2N-NH<sub>4</sub>OH로 elute하여 아미노산을 용출시켜 온수욕상에서 농축 0.2N-HCl 및 citrate buffer로 pH 2.2로 조정 각 시료 2ml과 0.2% ninhydrin 1ml를 100°C에서 10분간 가열 반응시킨 다음 용량을 다시 25ml로 만들어 O.D가 570m $\mu$ 에서 0.8~1.5 되도록 조정하여 amino acid autoanalyzer 시료로 하여 아미노산을 분석하였다. 그리고 amino acid analyzer의 분석조건은 Table 4와 같다. 얻어진 아미노산의 chromatogram은 표준품과 대조하여 각 peak의 height와 width를 곱한값을 standard constant로 나누어 아미노산의 농도를  $\mu$  mole로 산출하여 정량치로 하였다.

#### (8) 비휘발성 유기산의 정량

##### (라) 비휘발성 총유기산도의 측정

Frank<sup>73)</sup>의 방법에 준하여 분말시료 10g에 모래 10g와 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g를 잘 혼합한 후 일단 건조시킨 다음 soxhlet추출기로 24시간 추출한 후 증류수 20cc를 가하여 가온하고 ether를 증발시킨 후 남은 혼합액을 여과하였다. 여액 5ml를 증류수로 100ml가 되도록 희석하고 음이온 교환수지(Ionen Auscher III)를 통과시킨 후 1.5N-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100ml로 용출하였다. 이 용출액 25ml을 삼각후라스크에 옮겨 70°C 온수욕상에서 암모니아 냄새가 없어질때까지 가열, 냉각한 다음 양이온 교환수지(Dowex 50W $\times$ 2)에 유속 1ml/min로 통과시키고 물로 세척한 후 한데 합하여 100ml로 한 다음 phenolphthalein을 지시약으로 0.001N-NaOH로 적정하였다. 한편 blank test는 25ml의 1.5N (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 가한 후 냉각하여 양이온 교환수지

\* 표준시료는 glucose, fructose는 10 $\mu$  정도 rhamnose, maltose, raffinose, glucose, sucrose,는 각각 20~30 $\mu$ 를 섞어서 만들었다.

\*\* 10% 무수구연산 무수 acetone 용액 (w/v)

\*\*\* 0.8% 무수붕산 무수 acetone 용액 (w/v)

Table 4. Analytical condition of amino acid by amino acid autoanalyzer.

Conditions	Neutral and acidic amino acid					Basic amino acid				
sample No.	standard amino acid	CURED	FORCED	YEAST	AGED	standard amino acid	CURED	FORCED	YEAST	AGED
sample size	each 0.1 $\mu$ mole	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	each 0.05 $\mu$ mole	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml
column	0.9×70cm					0.9×15cm				
resin	amberiteCG-120 (25~28u)					amberite CG-120 (19~22u)				
flow rate of buffer sol. & ninhydrin reagent	100ml/hr 50ml/hr					100ml/hr 50ml/hr				
column temp.	49°C	49°C	51°C	50°C	52°C	49°C	49°C	50°C	52°C	52°C
buffer solu.	pH 3.25 and 4.25 0.2N-citrate buffer sol.					pH 5.28 0.35 N-citrate buffer sol.				
time of buffer change and analysis time	57min 140min					60min				
chart speed	9inch/hr					9inch/hr				

를 통과시켜 적정한 후 다음식에 의하여 총산을 계산하였다.

$$\text{Total acidity} = \frac{80 \times (\text{meq of NaOH tit.} - \text{meq of NaOH tit. of blank})}{\text{Weight of tobacco sample (grams)}}$$

(나) 휘발성 유기산의 paper chromatography 분석.

Forest<sup>74)</sup> Wada,<sup>75)</sup> Choi,<sup>76)</sup> Block<sup>77)</sup> Satake<sup>78)</sup>의 방법에 준하여 시료 10g을 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 pH 2가 되도록 조절하고 soxhlet 추출장치에 넣어 48시간 ether로 추출한 다음 ether를 제거시키고 20ml의 증류수로 용해 여과하여 여액을 paper chromatography 시료로 하였다. paper chromatography는 2차원 전개로 Toyo 여지 No. 50를 사용 3λ·5λ·10λ·20λ·30λ·40λ·50λ·75λ씩 spotting하여 1차 전개는 ethanol: ammonia: water (80:5:15)를 2차 전개는 phenol:water: formic acid (75:1:3)를 각각 사용하여 20~25°C에서 15~16시간 전개시켰다. 발색제로는 bromophenol blue 용액을 사용하였다.

표준산 용액은 50% acetone에 녹여 2% 용액으로 만들었다. 표준곡선의 작성은 표준산 2% 용액을 1, 3, 5, 7, 10, 15λ씩 여지에 올려 전개하고 발색시켜 정색 부분을 planimeter로 측정하고 측정치를 semilogarithm 지에 정색면적과 함량을 가지고 작도하였다. 그다음 시료의 정색면적이 표준곡선의 유효부분과 일치되도록 시료량을 조절하여 상기 방법에 따라 각 유기산을 정량하였다.

(9) 휘발성 유기산의 정량

(가) 휘발성 총유기산의 정량

Satake<sup>78)</sup>의 방법에 준하여 분말시료 10g에 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ml와 acetone 200ml를 넣어 정온 진탕기로 1시간 추출하였으며 추출액은 glass filter로 여과하고 잔사를 50ml acetone으로 2회 세척, 여액과 세척을 합한것에 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 10ml를 가하여 alkali성으로 한 다음 60°C 수욕상에서 acetone을 증발시켰다. 다음에 농 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5ml를 가하여 강산성으로 하고 증류속도 3~4ml/min으로 수증기 증류하고 유출액은 100ml씩을 취하여 phenolphthalein을 지시약으로 0.02N-NaOH로 적정하여 총휘발성 산량을 CH<sub>3</sub>COOH로 산출하였다.

(나) Gas chromatography에 의한 휘발성 유기산분석

시료의 조제는 Kaburaki<sup>79)</sup>의 방법에 준하였으나 그 밖에 여러 방법<sup>80,81,82,83,84,85)</sup>도 참고로 하여 주로 분말시료 100g에 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100ml를 가해 강산성으로 하여 수증기 증류를 하고 이 유출액 1.5l을 취하여 NaCl로 포화시킨 다음 ethyl ether 150ml씩으로 5회 추출하여 수층을 버린 다음 ether 층은 12% HCl 45ml로 3회 세척 염기성

분을 제거한 후 5% NaOH 용액 45ml로 3회 추출한 용액을 다시 농 HCl로 강산성 (pH 1)으로 하여 ether로 5회 추출액을 매 250ml 당 NaCl 포화용액 5ml씩으로 세척한후 MgSO<sub>4</sub>로 탈수, 질소가스를 통하면서 농축시켜 산성부를 얻는다.<sup>80)</sup> methyl ester 합성은 Kaburaki의 diazo methane 합성법<sup>79)</sup>에 의하여 합성반응 후 여분의 diozomethane은 양이온 교환수지 amberlite IRC 50을 가하고 병냉하에 방치후 glass filter로 여과하여 그 여액을 gas chromatography 시료로 하였다.

gas chromatography에 의한 분석 조건은 다음과 같다.

gas chromatography 분석기기: Shimadzu model2B  
 column: PEG 20M      column temp.: 80°C  
 carrier gas: He      flow rate: 50ml/min  
 sample size: 0.2ml      range: 8mv  
 chart speed: 2cm/min      detector: T.C.D.

각성분의 동정은 유기산 ester의 표준물을 상기 조건과 같이 전개하여 표준물질의 peak를 각각 확인하고 각 유기산의 retention time를 결정 한 후 조제한 잎담배 시료의 gas chromatogram과 비교, 동정, 정량하였다.

#### (10) alkaloid의 정량

##### (가) Total alkaloids의 정량

CORESTA standard method<sup>69)</sup>의 알카로이드 분석방법에 의하여 조제한 시료를 분석하였다. 즉 total alkaloid의 정량은 Kjeldahl flask에 분말시료 1g를 넣고 NaCl 20~40g과 8N-NaOH 용액 5ml를 넣어 증류하여 그 유출물을 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15ml로 회수하고 이 회수된 유출물을 250ml mess flask에 채워 이중 25ml을 0.05N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 다시 희석시킨것을 Beckman D.U. spectrophotometer로 파장 236, 259, 282m $\mu$ 에서 O.D.를 측정 다음식에 의하여 정량하였다.

$$\text{percent nicotine in dry sample} = \frac{100A.v.m.}{34.3 \text{ d.b.t.} \left[ \frac{100-M}{100} \right]}$$

##### (나) Nicotine 및 nornicotine의 정량

Nicotine과 nornicotine의 정량은 Bowen 등,<sup>86)</sup> Giriffith<sup>(87)</sup>의 원리와 Kobashi<sup>(88)</sup>의 방법을 참고하여 nornicotine을 NaNO<sub>2</sub>와 작용시켜 비 휘발성인 제2아민으로 만든다음 수증기증류로 nicotine을 분리하여 spectrophotometer로 파장 236, 259, 282m $\mu$ 에서 O.D.를 측정 전기식에 의하여 계산하였다. 그리고 nornicotine은 total alkaloids에서 nicotine

량을 뺀 값으로 하였다.

#### (11) 연기중의 nicotine 및 tar의 정량

##### 가) 연기의 포집방법

CORESTA 방법<sup>89)</sup>에 따라 시료 잎담배를 각각 균일하게 cigarette로 만들어 수분 12%로 조화한 다음 cigarette를 smoke collected trap에 끼우고 점화하여 pipeting machine으로 일정량의 연기를 흡연한다음 holder 중의 Cambridge filter CM 113A에 포집된 연기를 무수 methanol로 추출한 다음 일정량으로 한다.

##### 나) 연기중 tar의 정량

연기추출물 일정량을 Karl Fisher reagent로 탈수한 잔량을 tar로 산출함.

##### 다) 연기중 nicotine의 정량

연기추출물 일정량을 잎담배의 nicotine정량 방법과 같이 수증기 증류후 증류물의 alkaloid를 Beckman D.U. spectrophotometer로 259m $\mu$  파장에서 O.D.를 측정하여 nicotine을 정량하였다.

### 5. 엽연초 발효속성의 생화학적 실험

#### a. 산소흡수량의 측정

Noguch<sup>25)</sup>의 방법에 준하여 Warburg 검압계를 사용해서 측정하였다. 즉 분말시료 300mg와 증류수 3ml을 Warburg flask의 주실에 넣고 부실에는 CO<sub>2</sub> 흡수제로 2N-NaOH 0.5ml를 가하고 28°C에서 1시간 진탕하여 산소흡수량을 측정하고 분말 1g에 대한 1시간의 산소흡수량( $\mu$ )으로 표시하였다.

#### b. 엽연초 효소액의 일반적인 조제법

엽연초 발효속성의 생화학적 실험에 사용한 각종 효소액은 전보<sup>48)</sup>의 일반적인 방법에 의하여 시료 2~3g을 0°C 냉동실에서 편취 이에 각 효소의 최적 완충액 또는 증류수 및 고운모래 2~3g을 가하여 사기질구에서 약 10분간 갈고 천으로 여과한다. 그액을 냉동원심분리(0°C 8,000~10,000 r.p.m. 20min)하여 그 상층액을 효소액으로 하였다.

#### c. 효소 활성도 측정 방법

##### (1) $\alpha$ -amylase 활성도 측정

Hirota<sup>89)</sup>의 Blue-value method에 준하여 효소액은 잎담배 시료 2g 및 McIlvain phosphate buffer (pH 7.0) 20ml을 사용해서 b.의 방법으로 조제하여 그를 사용하였다. 효소반응은 완충액 4ml, 1% 가용성 전분용액 5ml을 혼합하여 40°C 수욕상에서 15분간 반응시켰다. 반응은 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10ml을 가하여 정지시키고 그 반응액 1ml에 0.001N-I<sub>2</sub>용



액 10ml을 가하여 파장 650 $\mu$ 에서 O.D.를 측정해서 건물 1g 당 변화한 O.D.의 백분률로서 효소의 활성도를 표시하였다.

### (2) $\beta$ -amylase 활성도 측정

$\beta$ -amylase 활성도의 측정은 Somogyi new method<sup>90)</sup>에 준하였다. 즉 시료 1g 및 McIlvain phosphate buffer (pH 6.0) 20ml로 b.의 방법에 의하여 효소액을 조제하고 그중 5ml을 cellophane tube에 넣고 환원성 물질을 투석, 제거시킨 후 0°C에서 20ml로 희석하였다. 그중 1ml을 취하여 buffer 용액 2ml와 1% 가용성 전분용액 2ml을 혼합하여 40°C 수욕상에서 30분간 반응시킨 다음 Somogyi new reagent에 의하여 생성된 환원당을 정량하였다.

효소단위는 같은 조건하에서 건물 1g 당 생성되는 glucose의 mg 수로 표시하였다.

### (3) Invertase 활성도 측정

전기  $\beta$ -amylase 측정법에 준하였다. 단, 기질로서 전분용액 대신 1% sucrose 용액을 사용하였다.

효소단위는  $\beta$ -amylase와 같다.

### (4) Catalase 활성도 측정

Euler<sup>91)</sup>의 I<sub>2</sub> 반응법에 준하여 시료 2g와 McIlvain phosphate buffer (pH 6.0) 20ml를 사용하여 전기 생화학실험 b.의 방법에 따라 효소액을 만들고 그 1ml을 buffer 용액 2ml, 증류수 2ml을 잘 혼합하여 그 각 1ml씩을 시험관에 넣고 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1ml을 가하여 반응시키고 10분 후 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2ml로 반응을 정지시킨 다음 5% KI 1ml을 가하여 5분간 방치한 후 1% 가용성 전분용액을 지시약으로 사용하여 0.05N-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>로 적정하였다. 이상의 실험은 0°C 이하에서 조작하였다. 효소단위는 같은 조건하에서 건물 1g 당 소모되는 0.005N-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>의 ml 수로 표시하였다.

### (5) peroxidase 활성도 측정

Akabori<sup>92)</sup>, Adams<sup>93)</sup> 등의 Warburg 검압법에 준하여 시료 3g와 Sørensen phosphate buffer (pH 7.0) 20ml을 사용하여 전기 효소액과 같은 방법으로 효소액을 만들고 그중 0.5ml을 Warburg flask 측실에 넣고 주실에는 기질로서 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1ml와 5% pyrogallol 0.5ml를, 부실에는 10% KOH 0.2ml를 넣어 25°C에서 10분간 평형에 도달케한 후 반응을 시켜 5분간 발생하는 CO<sub>2</sub>의 양을 측정하였다. 효소단위는 같은 조건에서 건물 1g 당 발생한 CO<sub>2</sub>의  $\mu$ l 수로 표시하였다.

### (6) Polypenol oxidase (o-diphenol oxidase) 활성도 측정

Adams<sup>93)</sup> Tomita<sup>94)</sup> 등의 Warburg 검압법에 준하여 시료 3g와 McIlvain phosphate buffer (pH 6.0) 20ml을 사용하여 다른 효소액과 같은 방법으로 효소액을 조제하여 그중 1ml을 취하여 주실에 넣고 측실에는 기질로서 M/100 chlorogenic acid 0.4ml를, 부실에는 10% KOH 0.2ml를 넣고 30°C에서 15분간 평행에 도달케 한 후 반응을 시켜 10분간에 흡수한 O<sub>2</sub>의 량을 측정하였다. 효소단위는 같은 조건하에서 건물 1g 당 흡수된 O<sub>2</sub>의  $\mu$ l 수로서 표시하였다.

## 6. 발효속성 및담배의 품질평가

### a. 품질 계수

Shumuck,<sup>61)</sup> Kovalenko, Pyriki,<sup>42)</sup> Phillips, Brückner<sup>43)</sup> 등의 품질계수에 따라 잎담배분석에서 얻어진 수치를 대입 계산하였다.

### b. 관능검사

발효속성 처리된 잎담배를 각구별로 cigarette를 제조하여 Kataoka<sup>95)</sup>의 방법에 준하여 시적하여 관능검사를 실시하였다.

## 실험 결과

### 1. 선택변화

#### a. 분광 반사율

분광 반사율을 측정한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 이들 그림에서 보는 바와 같이 반사율은 최저 파장인 415 $\mu$ 에서 17.0% 최고파장 685 $\mu$ 에서 62%이었으며 일반적으로 505~625 $\mu$ 범위에서 현저하게 증가되는 경향을 나타내고 있다. 어느 시험구에서나 일반적으로 발효가 진행됨에 따라 5~10일 사이에는 반사율이 큰 차이가 없으며 15~30일일에 415 $\mu$ ~475 $\mu$  범위의 파장에서 상당히 반사율이 낮아지는 경향이 있다. 또한 505 $\mu$ ~685 $\mu$  파장범위에서도 거의 같은 경향을 보여주고 있다. 그리고 숙성구 및 효모구에 있어서 반사율 및 발효에 따르는 반사율의 변동은 표면이나 이면에서 큰 차이가 없었다.

#### b. 색의 좌표치와 3속성치

색의 명도는 Fig. 3의 결과와 같으며 잎의 이면이 표면보다 상당히 높으며 효모구와 숙성구간에는 별 차이가 없었다. 일반적으로 표면 및 이면이 다같이 효모구가 다른 구에 비하여 약간 낮은 경향을 나타내고 있다. 숙성구(1~2년)의 표면의 명도는 효모구 30일 것보다 약간 낮으나 이면은 효모구 30일의 것과 거의 같았다. 발효 일수가 경과

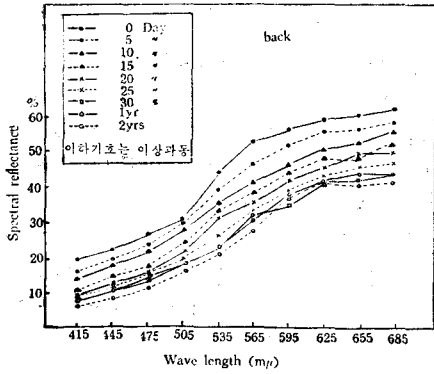
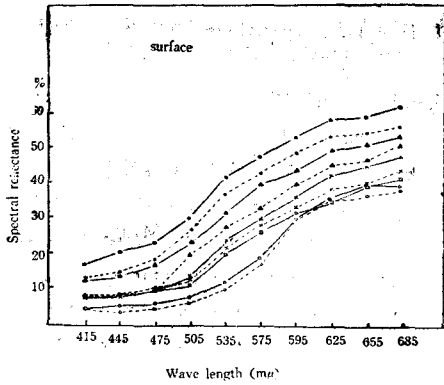


Fig. 1. Percent spectral reflectance of FORCED tobacco leaves.

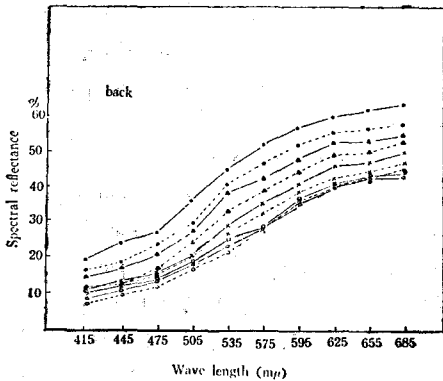
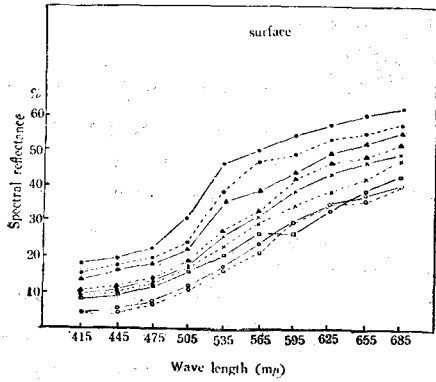


Fig. 2. Percent spectral reflectance of YEAST tobacco leaves.

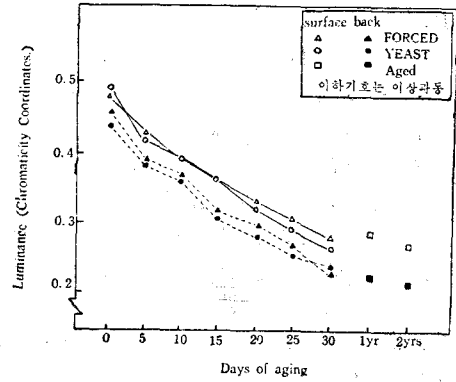


Fig. 3. Change of luminance of forced and aged tobacco leaves.

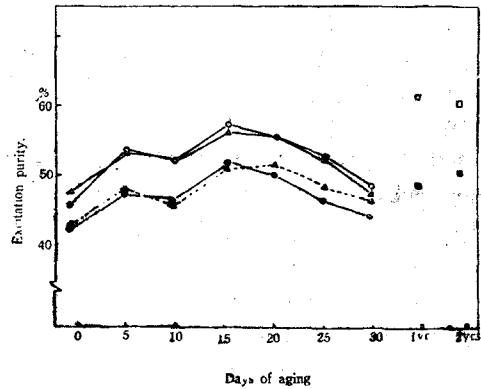


Fig. 4. Change of excitation purity of forced and aged tobacco leaves.

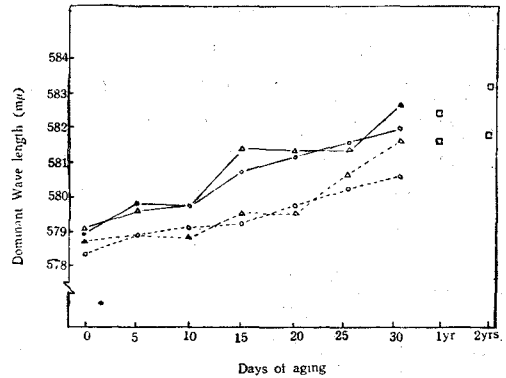


Fig. 5. Change of dominant wave length of forced and aged tobacco leaves.

함에 따라 명도는 점차 감소되어서 25~30일에 이르러 숙성구(1년 및 2년)와 거의 비슷하게 된다. 자극순도는 Fig. 4와 같이 표면이 이면보다 높으며 효모구는 표면이 숙성구 보다 약간 높으나 이면은 숙성구 보다 약간 낮은 경향을 나타내고 있다. 발효일수에 따른 자극순도의 변화는 15일에 가

Table 5. Combustibility and bulkness of tobacco leaves.

Item	Sample	CURED (0 days)	FORCED (20 days)	YEAST (20 days)	AGED (2 yrs)
combustibility(min sec/60mm)		22.08	20.53	20.17	20.04
bulkness(ml/15g)		44.7	45.1	46.6	47.2

Table 6. The analytical data of common constituents.

Item	Sample	CURED (0days)	FORCED (20days)	YEAST (20days)	AGED (2yrs)
equilibrium moisture contents		18.30	18.20	17.90	17.60
total sugars		23.15	19.26	20.07	18.64
reducing sugars		17.04	17.01	17.88	17.73
total reducing materials		20.29	20.46	21.33	21.38
total nitrogen		1.89	1.62	1.63	1.60
proteins		5.89	5.45	5.51	5.40
amide nitrogen		0.32	0.33	0.31	0.30
nitrate nitrogen		0.22	0.23	0.25	0.25
ammonia nitrogen		0.37	0.36	0.35	0.35
total organic acids		8.61	9.51	9.29	9.85
total volatile organic acids		0.18	0.25	0.26	0.18
total non volatile organic acids		8.53	9.26	9.03	9.67
crude fiber		12.50	12.70	12.50	12.90
ash		9.45	9.57	9.65	9.80
ether extracts		7.54	8.51	8.47	7.99
petrol. ether extracts		5.49	5.46	5.62	6.24
resins		4.92	5.53	5.30	5.34
alkaloids		2.40	2.09	2.15	2.35
pectins		7.20	7.23	7.18	7.09
nicotine in smoke (mg/60mm)		2.11	2.00	2.06	2.23
tar in somoke (mg/60mm)		37.15	32.50	35.70	36.04
pH		5.30	4.98	4.95	4.80
alkalinity (ml/0.01gN-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /g)		0.40	0.39	0.36	0.35

장 높았으며 숙성구 (1년 및 2년) 는 15일 것보다 표면이 5%가량 높고 이면은 비슷하였다. 주재파장은 Fig. 5와 같이 숙성구가 효모구 보다 일반적으로 약간 높은 경향을 나타내며 숙성구와 숙성구에 있어서 그 값은 비슷하였다.

c. 연소성 및 팽창성

본 실험의 4가지 시료에 대한 연소성 및 팽창성을 측정한 결과는 Table 5와 같다.

연소성은 효모구와 숙성구의 앞담배는 미처리구에 비하여 빠르며 팽창성은 약간 크다.

6. 앞담배 발효숙성에 따른 미생물의 변동

앞담배 발효숙성에 따른 생균수의 측정 결과는 Fig. 6와 같이 효모는 숙성 초일에 6,500이었던 것이 차차 증가하여 15일에 가서 135,000으로 최고에

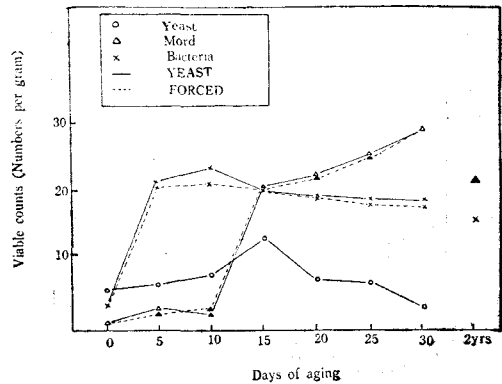


Fig. 6. Viable counts of microorganisms during forced aging of tobacco leaves

달하였다가 다시 점차적으로 감소하여 발효숙성 30

일에는 30,000으로 되었다. 곰팡이는 발효속성 초일에 5,000이었던 것이 발효속성 5일에는 급격히 증가하여 37,000에 이르고 계속 증가하여 30일에는 270,000에 이르렀다. 세균은 발효속성 초일에 43,000이었던 것이 5일에는 210,000, 10일에는 230,000으로 급격한 증가를 보이다가 15일 이후는 계속 감소하여 30일에는 184,000까지 감소되었고 세균과 곰팡이의 microflora 변동은 효모구와 속성구가 같은 경향을 나타냈으며, 세균은 aerobic bacteria의 *Bacillus* 속이 90% 이상이며, 곰팡이는 *Aspergillus* 속이 90% 이상이었다.

### 3. 발효속성 앞담배의 일반성분 변동

미처리구·속성구·20일 발효의 효모구 및 속성구의 4개 시료에 대한 일반 화학성분 분석결과를 종합하면 Table 6과 같다. 즉 각처리별 성분의 차이가 크게 나타난것은 pH 총 휘발성유기산 및 산소흡수량의 변화이었다.

즉 pH는 Fig. 7과 같이 25~30일에 이르러 속

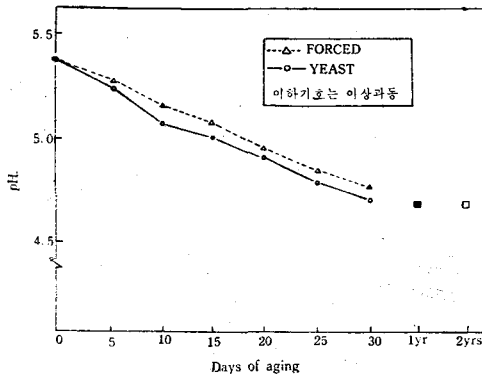


Fig. 7. pH changes during forced aging of tobacco leaves.

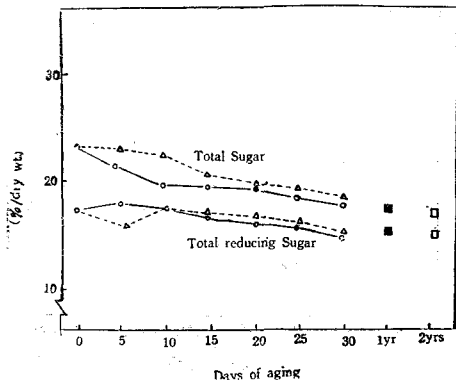


Fig. 8. Changes of total sugars, total reducing sugars during forced aging of tobacco leaves.

성구와 거의 일치되는 값을 나타내고, 전당 및 환원당의 변화는 Fig. 8과 같으며, 전당의 변화는 두가지 시험구가 다 같이 발효속성이 진행됨에 따라 대체적으로 감소하는 경향을 나타내나 환원당의 변화는 발효가 진행함에 따라 속성구 및 효모구는 발효속성 5일까지는 약간 감소하나 그 이후는 큰 변화가 없다.

전기 두가지 시험구의 발효속성중 전질소 및 단백질의 변화는 Fig. 9과 같으며, 모다 발효속성 일수에 따라 뚜렷한 변화는 볼 수 없으며 점차 약간씩 감소 하였다.

에틸추출물 및 석유에틸추출물의 발효속성에 따른 변화는 Fig. 10과 같이 에틸추출물은 속성구와 효모구가 모두 발효속성 20일에 급격히 증가하고 그외는 별로 변동이 없으며, 석유에틸추출물은 속성구와 효모구가 모두 속성 5일에 약간 증가하고 그외는 별 변동이 없었다.

발효속성중의 알카로이드의 변화는 Fig. 11과 같이, 효모구는 속성 20일 이후 약간 감소하였고 속성구는 속성 5일까지 현저히 감소하다가 그 이

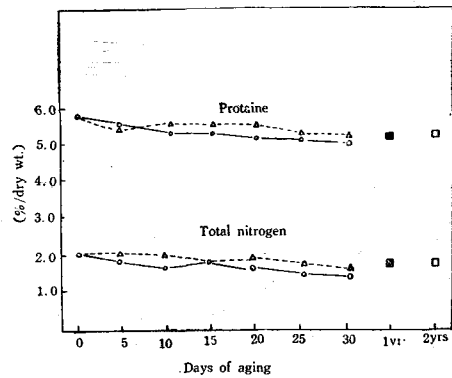


Fig. 9. Changes of total nitrogen, protein during forced aging of tobacco leaves.

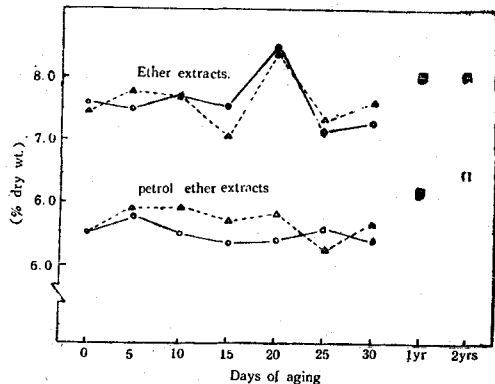


Fig. 10. Changes of ether and petroleum ether extracts during forced aging of tobacco leaves.

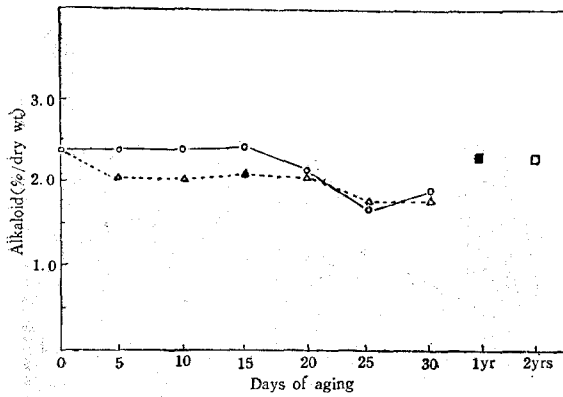


Fig. 11. Changes of alkaloid content during forced aging of tobacco leaves.

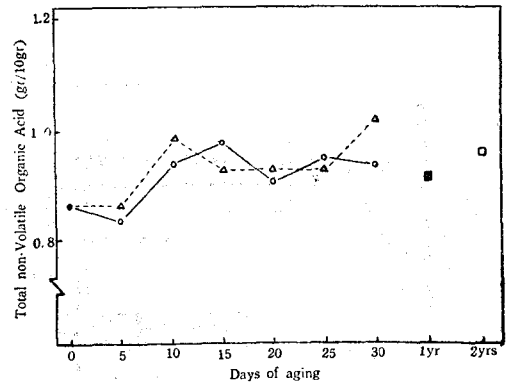


Fig. 14. Changes of Total non-volatile organic acids during forced aging of tobacco leaves.

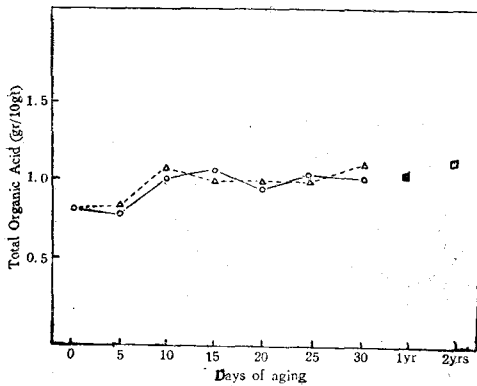


Fig. 12. Changes of total organic acid during forced aging of tobacco leaves.

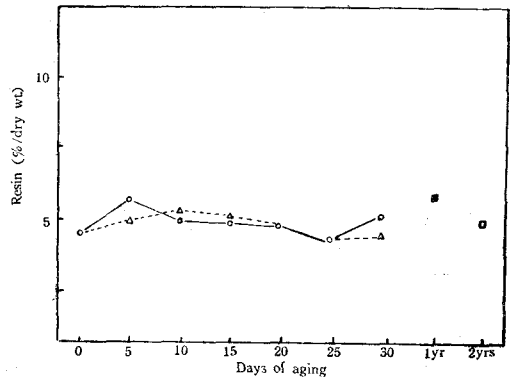


Fig. 15. Changes of resins during forced aging of tobacco leaves.

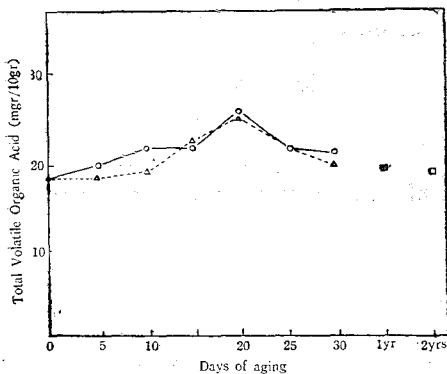


Fig. 13. Changes of total volatile organic acids during forced aging of tobacco leaves.

후는 큰 변동이 없었다.

숙성에 따른 총유기산의 변화는 Fig. 12 총휘발성 유기산의 변화는 Fig. 13과 같고 총비휘발성 유기산의 변화는 Fig. 14와 같으며, 총유기산은 숙성 15일까지는 현저하게 증가하였다가 그 이후 점차 감

소하였다. 총 휘발성 유기산은 두가지 시험구가 다 같이 숙성 20일에 최고에 달하였다가 그후 다시 감소하였으며 총비휘발성 유기산은 총유기산의 변동과 큰 차이가 없었다. 숙성중의 수지의 변화는 Fig. 15와 같으며 숙성에 따라 점차 증가하고 있다.

#### 4. 잎담배 발효숙성중의 특수 성분변화

##### a. 색소류

미처리, 숙성, 효모, 숙성의 4시료구 잎담배의 carotenoides 색소류의 함량은 Fig. 17의 chromatogram 및 Table 7에 표시된 바와 같았다.

이 결과를 보면 효모구는 숙성구급 미처리구보다 색소량이 25~50% 적으며 숙성구 (1년 및 2년) 보다는 10~20% 적었다. 어느 특별한 색소만이 특히 다량 감소하지는 않았고 3종의 carotenoides 색소들의 감소율은 다 같았다.

##### b. 당 류

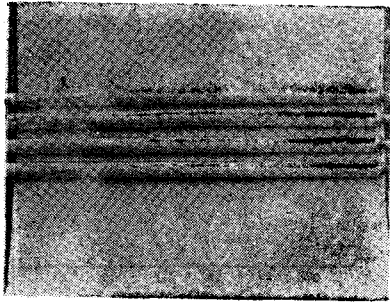


Fig. 16. Column chromatogram of pigments in tobacco leaves (YEAST 20days)

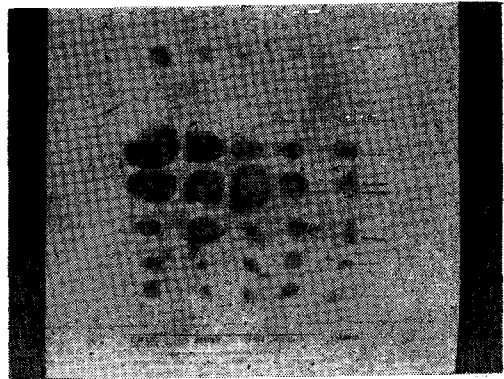


Fig. 17. Paper chromatogram of free sugars in various tobacco leaves

Table 7. Carotenoids contents of various tobacco leaves.

Sample	Item Unit	xanthophyll		violaxanthine		carotene	
		mg/g	%	mg/g	%	mg/g	%
CURED (0day)		0.25	100	0.10	100	0.3	100
FORCED (20days)		0.018	70	0.07	70	0.26	87
YEAST (20days)		0.15	59	0.06	60	0.14	45
AGED (1yr)		0.22	89	0.07	67	0.29	95
(2yrs)		0.18	71	0.06	58	0.18	60

Table 8. Sugar contents of various tobacco leaves.

Item	Sample	CURED (0day)	FORCED (20days)	YEAST (20days)	AGED (2years)
rhamnose		8.70	1.26	5.47	2.74
glucose (galactose)		89.78	75.00	71.70	42.00
fructose		73.75	90.00	90.25	91.00
sucrose		59.05	43.35	37.50	10.05
maltose		3.19	1.65	6.30	8.25
raffinose		4.87	3.00	8.25	23.25

Table 9. Amino acids content of various tobacco leaves.

Item	Sample	CURED (0day)	FORCED (10days)	YEAST (10days)	FORCED (20days)	YEAST (20days)	AGED (2yrs)
aspartic acid		10.41	12.56	20.71	5.12	04.62	35.67
threonine		0.33	1.07	7.74	0.26	4.69	5.69
serine		22.09	22.07	35.50	21.84	43.70	59.63
glutamic acid		0.47	11.86	23.22	0.15	8.57	18.66
proline		169.77	200.03	201.09	117.78	25.18	393.10
glycine		9.50	4.67	6.53	8.23	88.40	2.36
alanine		42.52	47.80	66.68	27.74	77.34	82.22
cystine		—	—	—	—	32.49	—
valine		0.28	3.21	4.83	0.30	—	0.23
methionine		—	—	—	2.48	—	—
iso-leucine		—	1.10	—	—	—	0.76
leucine		—	2.76	—	—	—	0.02

발효숙성진행에 따른 각당류의 변화는 Fig. 17과 같은 chromatogram을 얻었으며 그 함량은 Table 8과 같았다. 이 결과를 보면 sucrose, rhamnose, glucose는 감소하였고 fructose, maltose, raffinose는 증가하였다.

c. 아미노산류

숙성, 효모, 숙성 및 미처리 4구의 잎담배중의 각유리아미노산량의 변화는 Fig. 18과 같은 Chromatogram을 얻었으며 그 함량은 Table 9와 같았다. 일반적으로 효모구는 다른 시료구에 비하여 유리 아미노산량이 많았으며 특이한 것은 4시료구에 있어서 다 proline 함량이 다른 아미노산보다 현저하게 많았다. 즉 효모구(20일)의 proline 함량은 숙성구의 1.5배나 되었고 숙성구 및 미처리구의 2.2배량이나 되었다. 한편 glycine 및 valine 만은 각 시료구간에 별차이가 없었다.

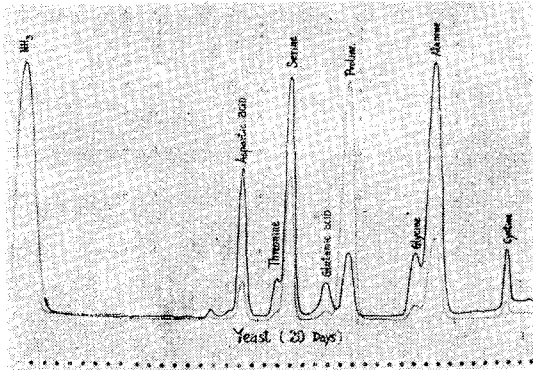


Fig. 18. Chromatogram of free amino acids in YEAST(20days) tobacco leaves.

d) 휘발성 유기산류

각시료구의 잎담배중의 휘발성 유기산의 변화는 Fig. 19와 같은 chromatogram를 얻었으며 그 함

량은 Table 10과 같았다. 이 결과에 의하면 효모구는 formic, acetic, propionic, n-butyric, iso-valeric, n-valeric acid가 숙성구보다 더 많았으며 isobutyric, crotonic, caprylic acid는 숙성구보다 그 함량이 적었다.

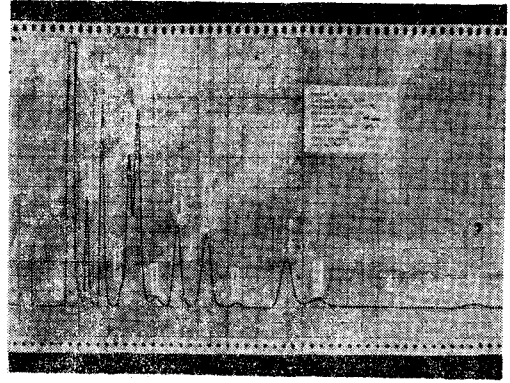


Fig. 19. Gas chromatogram of volatile organic acids in AGED (2yrs) tobacco leaves.

e) 비휘발성 유기산류

각시료구의 비휘발성 유기산의 변화는 Fig. 20과 같은 chromatogram을 얻었으며 그 함량은 Table 11과 같이 효모구는 숙성구(2 yrs)보다 잎담배에 함유된 유기산 중 그 대부분을 차지하는 malic acid 및 oxalic acid가 다량 함유되어 있었으나 citric acid는 오히려 적은량 함유되어 있었다. 미량 함유된 산인 malonic, α-ketoglutaric, 및 유기산중 fumaric acid의 함량은 효모구가 숙성구보다 많았다. 기타 특히 glutaric acid는 효모구가 숙성구보다 현저하게 많았으며 galacturonic, tartaric 및 succinic acid는 효모구가 숙성구보다 적었다.

f) Polyphenol 류

잎담배중의 polyphenol 화합물 중 chlorogenic acid

Table. 10. Volatile organic acids content of various tobacco leaves. (mg/10g)

Item	Sample	CURED (0day)	FORCED (20days)	YEAST (20days)	AGED (2yrs)
formic acid		1.87	4.21	3.35	0.78
acetic acid		1.77	3.05	2.97	1.38
propionic acid		2.21	3.11	3.78	1.92
iso-butylic acid		3.52	4.76	4.51	5.01
n-butylic acid		1.73	2.22	2.70	1.70
iso-valeric acid		1.82	2.74	3.52	1.57
n-valeric acid		1.71	2.54	3.62	1.40
crotonic acid		1.16	1.43	0.72	2.66
caprylic acid		1.63	0.97	1.09	1.43

Table. 11. Non volatile acids content of various tobacco leaves. (mg/10g)

Item	Sample	CURED (0day)	FORCED (20days)	YEAST (20days)	AGED (2Yrs)
oxalic acid		91.8	85.4	95.8	87.8
citric acid		175.6	215.5	191.5	239.4
malic acid		239.4	255.4	263.3	159.6
galacturonic acid		9.5	27.0	13.0	7.0
tartaric acid		7.2	13.0	8.0	5.0
malonic acid		40.0	16.0	48.0	27.0
$\alpha$ -ketoglutaric acid		12.0	42.0	53.0	10.0
fumaric acid		19.0	40.0	64.0	29.0
succinic acid		53.0	44.0	37.0	61.0
glutaric acid		3.0	4.0	61.0	14.0

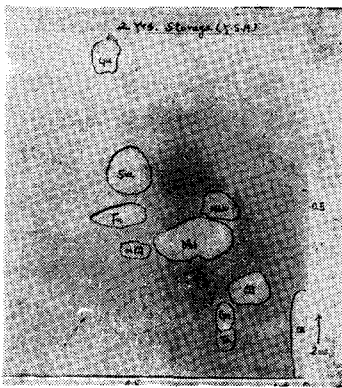


Fig. 20. Paper chromatogram of non volatile organic acids in AGED (2yrs) tobacco leaves.

및 caffeic acid의 변화는 Fig. 21와 같은 chromatogram을 얻었으며 그 함량은 rutin을 포함해서 Table 12과 같다. polyphenol 중 rutin, chloro-

genic 및 caffeic acid의 함량은 미처리구가 가장 많고 rutin 함량은 숙성구가 특히 적어서 미처리구의 거의 반량 밖에 되지 않았다.

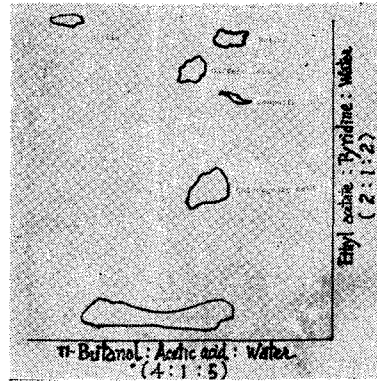


Fig. 21. Paper chromatogram of polyphenols in forced tobacco leaves.

Table. 12. Polyphenols content of various tobacco leaves (% dry wt.)

Item	Sample	chlorogenic acid	caffeic acid	rutin
CURED		3.25	0.35	1.00
FORCED (10days)		3.10	0.32	0.70
YEAST (10days)		3.05	0.30	0.69
FORCED (20days)		3.05	0.30	0.40
YEAST (20days)		2.95	0.30	0.50
FORCED (30days)		2.85	0.29	0.35
YEAST (30days)		2.80	0.27	0.45
AGED (2yrs)		3.15	0.28	0.50

g) Nicotine 및 nornicotine

잎담배의 발효숙성에 따른 nicotine 및 nornicotine 함량의 변동은 Fig. 22 및 Fig. 23과 같았다. 이 결과를 보면 nornicotine 함량은 nicotine 함량보다 숙

성에 의해서 더 현저하게 감소함을 알 수 있었다.

5. 잎담배 발효 숙성중의 생화학적 변화

a. 산소흡수량

잎담배의 발효숙성에 따른 산소흡수량의 변화는



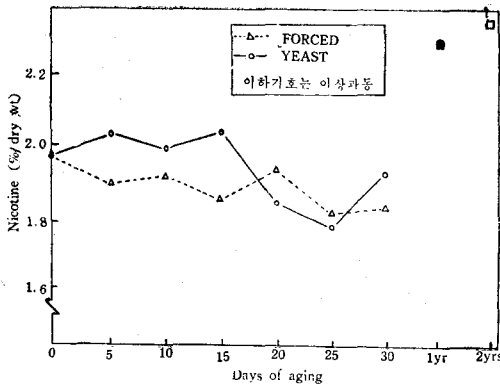


Fig. 22. Changes of nicotine content during forced aging of tobacco leaves.

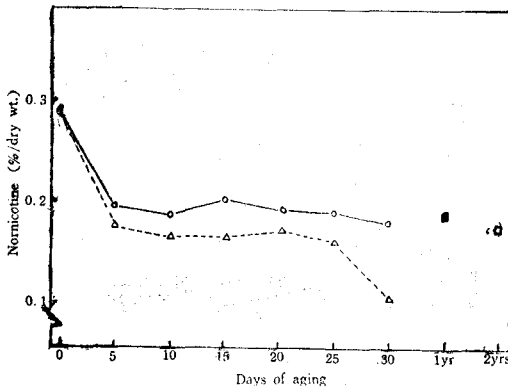


Fig. 23. Changes of nornicotine content during forced aging of tobacco leaves.

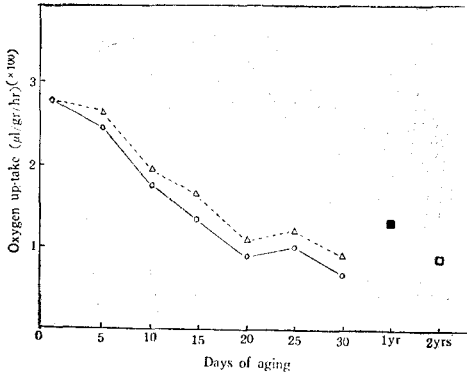


Fig. 24. Changes of oxygen up-take during forced aging of tobacco leaves.

Fig. 24와 같으며 잎담배의 산소흡수량은 숙성전 280 $\mu$ l/g/hr 이었던 것이 발효숙성이 진행됨에 따라 점차 감소하여 숙성 20일에는 85~95 $\mu$ l/g/hr 로 되었으며 그후는 더욱 서서히 감소하여 30일에는 70~80 $\mu$ l/g/hr 로 되었다.

b. 효소활성도의 변화

(1)  $\alpha$ -Amylase 활성도

엽연초 발효에 따른  $\alpha$ -amylase 활성도의 변화는 Fig. 25와 같이 숙성일수가 경과함에 따라 점차 낮아졌으며 전숙성기간중 효모구는 숙성구보다 그 활성도가 약간 높았다.

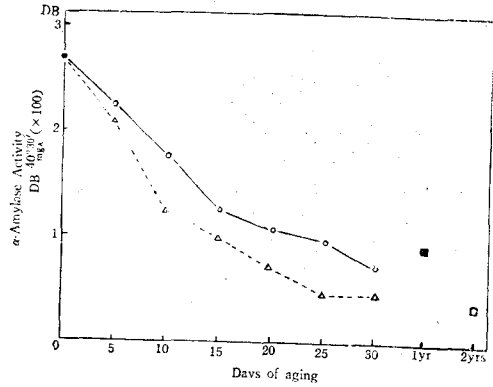


Fig. 25. Changes of  $\alpha$ -amylase activity during forced aging of tobacco leaves.

(2)  $\beta$ -Amylase 활성도

잎담배 숙성에 따른  $\beta$ -amylase 활성도의 변화는 Fig. 26과 같이 효모구는 숙성 20일까지 계속 낮아졌고 숙성구는 처음 5일 동안에는 낮아지다가 10일부터 다시 높아져서 15일에 이르러서는 높은 활성도를 보인 다음 그후 낮아졌다.

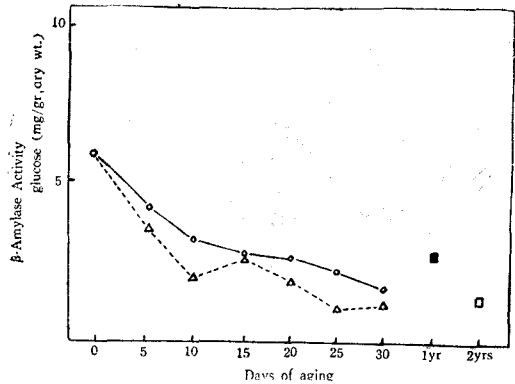


Fig. 26. Changes of  $\beta$ -amylase activity during forced aging of tobacco leaves.

(3) Invertase 활성도

잎담배 숙성에 따른 invertase 활성도의 변화는 Fig. 27과 같이 숙성이 진행됨에 따라 15일까지는 점차 낮아지다가 그후 다시 활성도가 높아져 20일에 가서 높은 값을 나타냈었다가 그후 다시 낮아졌다. 그리고 효모구는 숙성구보다 전숙성기간중 약간 높은 활성도를 보여주었다.

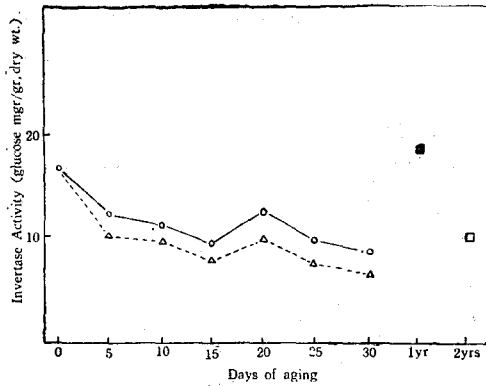


Fig. 27. Changes of invertase activity during forced aging of tobacco leaves.

(4) Catalase 활성도

잎담배의 숙성에 따른 catalase 활성도의 변화는 Fig. 28에 표시된바와 같이 숙성전 상당히 높은값을 보이다가 숙성 10일에 이르는 사이에 급격히 낮아지고 효모구는 10일부터 다시 활성을 회복하여 20일에는 높은 활성을 나타내고 그후 다시 감소하였는데 숙성구는 처음부터 계속 낮아지다가 25일 경에가서 활성을 약간 회복하고 있었다.

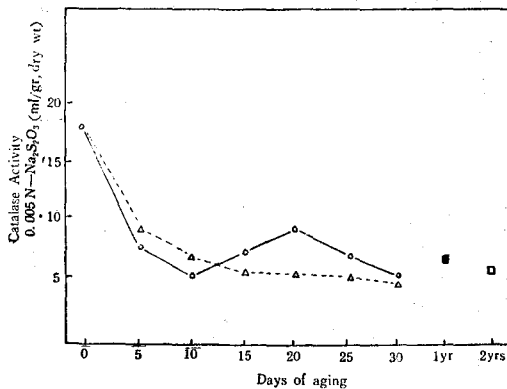


Fig. 28. Changes of catalase activity during forced aging of tobacco leaves.

(5) Peroxidase 활성도

잎담배 숙성에 따른 peroxidase의 활성도의 변화는 숙성 5일에는 약간 높아지고 그후 서서히 낮아져 15일에 이르러 가장 낮아졌고 그후 다시 높아지는 경향을 보여주었다. 전숙성기간중 효모구는 숙성구에 비하여 더 높은 활성도를 나타내고 있었다.

(6) Polyphenol oxidase 활성도

잎담배 발효에 따른 polyphenol oxidase 활성도의 변화는 Fig. 30에 표시된 바와 같이 숙성전에

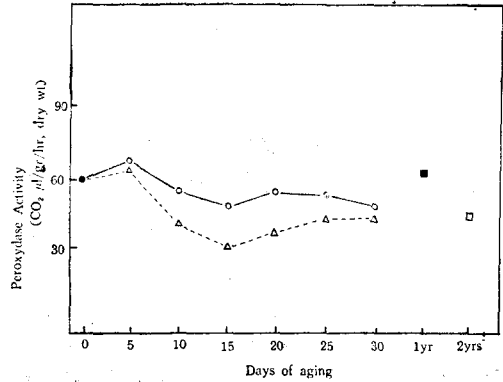


Fig. 29. Changes of peroxidase activity during forced aging of tobacco leaves.

는 상당히 높은 값을 보이다가 숙성이 진행됨에 따라 계속 낮아졌다. 효모구와 숙성구간에는 그 활성도가 별차이가 없었다.

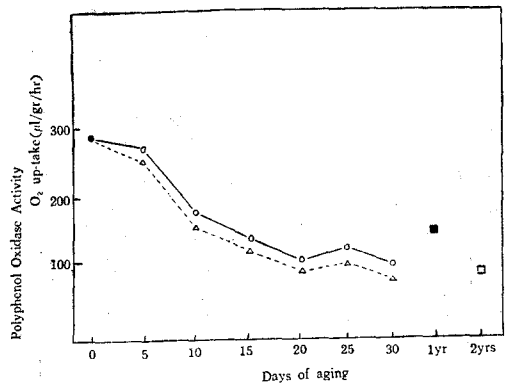


Fig. 30. Changes of polyphenol oxidase activity during forced aging of tobacco leaves.

6. 발효숙성된 잎담배의 품질평가

a. 품질계수

발효숙성이 끝난 잎담배의 품질에 대하여 이화학적 분석치를 다음 연구자들에 의한 품질계수에 적용한 수치는 Table 13과 같았다.

(1) Shmuck

- |   |  |
|---|--|
| a) $\frac{\text{담배질 \%}}{\text{환원당 \%}}$    | b) $\frac{\text{환원당 \%}}{\text{전질소\%-니코틴 태질소\%}}$    |
| c) $\frac{\text{전환원성물질 \%}}{\text{담배질 \%}}$ | d) $\frac{\text{전환원성물질 \%}}{\text{전질소\%-니코틴 태질소\%}}$ |

(2) Kovalenko

- |   |  |
|---|--|
| e) $\frac{\text{전환원당 \%}}{\text{전질소 \%}}$ | f) $\frac{\text{Polyphenol \%}}{\text{전환원성물질 \%}}$ |
|---|--|

(4) Pyriki

g)  $\frac{\text{전환원성물질}\% + \text{resine 및 wax}\% \times 400}{\text{니코틴}\% + \left(\frac{\text{전질}}{\text{소}\%} - \text{니코틴}\frac{\text{태질}}{\text{소}\%}\right) + \text{회분}\%}$   
 ☆전환원성물질, 환원당, polyphenol은 glucose로 계산함

Table 13. Quality index of various tobacco samples.

	CURED	FORCED	YEAST	AGED
a	2,98 (100)	3,12 (104)	3,25 (109)	3,28(110)
b	11,28 (100)	13,39 (118)	13,86 (122)	14,57(129)
c	3,61 (100)	3,75 (103)	3,87 (107)	3,98(110)
d	14,18 (100)	15,86 (111)	16,53 (116)	17,52(123)
e	9,07 (100)	10,51 (115)	10,96 (120)	11,08(122)
f	0.19 (100)	0.17 (111)	0.16 (118)	0.17(111)
g	784 (100)	803 (102)	813 (103)	799(101)

Shmuck<sup>61)</sup>, Kovalenko의 탄수화물의 질소화합물에 대한 비인 a, b, c, d, e가 모다 숙성구, 효모구, 숙성구, 미처리구순으로 숙성에 따라 품질이 향상된

Table 14. Sensory evaluation of various tobacco samples.

Item \ Sample	aroma	taste	mildness	pungency	quality	grade
CURED (0days)	31.0	28.5	29.5	37.0	28.5	4
FORCED (20days)	34.0	36.0	35.0	34.5	34.5	3
YEAST (20days)	35.0	36.5	37.5	34.5	35.5	2
AGED (2yrs)	35.0	35.0	33.0	28.5	36.0	1

### 고찰

일반적으로 건조 잎담배의 숙성축진 법으로서 가장 기본적인 인자는 온도와 습도이다. 즉 온도의 상승과 잎담배의 수분의 증가는 저장중의 잎담배의 여러가지 이화학적 특성에 큰 영향을 끼침으로 이같은 효과를 얻을 수 있다는 것으로 알려졌다.<sup>96)</sup> 필자도 본 실험에서 잎담배의 숙성을 촉진시키는 기본적인 방법으로서 온도와 수분 함량을 높여주는 방법을 선택하였다. 필자는 예비 실험을 한 결과 잎담배의 숙성을 촉진시키는데는 온도 40°C, 평행습율 18%, 관계습도 74%로 놓아두는 것이 가장 효과적이라는 것을 알게되었다. 즉 이조건으로 잎담배를 숙성시킬때는 효모를 첨가하여 발효시켜도 본 실험에 공시된 *Hansenula angusta*의 생육은 잘되게하나 곰팡이의 번식은 잘 막을 수 있다는 이점이 있으며 이 방법으로 약 20일간 숙성을 촉진시킨 효모구와 숙성구의 잎담배 제품은 상술한 실험결과에도 나타난 바와 같이 관능검사, 이화학적 성질의 조사, 생화학적 실험등의 결과로 보아 1년 및 2년 저장 숙성시킨 잎담배와 그품질 특

뚜렷한 경향을 보였으며 Shmuck<sup>61)</sup>와 Pyriki<sup>42)</sup> 등의 Polyphenol과 환원성물질간의 비인 f도 같은 경향이었다. Pyriki의 세밀한 포인 g는 적합하지는 않았으나 숙성 처리가 품질이 향상된 일정한 경향은 알 수 있었다.

Philips 등의 환원당과유기산과의 관계는 품질과의 유의성을 인정할 수 없었다.

Bückner<sup>43)</sup>의 계수는 숙성처리된 잎담배의 품질 비교 평가에는 적합하지 않았다.

### b. 관능검사

발효숙성된 잎담배를 각 시료구별로 제품으로 만들어 전문기술자들이 시각평가한 결과는 Table 14와 같으며 효모구는 외관이 좋고 미처리구는 자극성이 강할편이었으며 숙성 및 효모구는 숙성구보다 껌미가 양호하였다. 그러나 모든 평가를 종합하면 숙성구가 좋은 담배였으며 그다음 효모구 및 숙성구의 순위가 되었다.

성이 비슷하게 된다는 것을 알게 되었으므로 이방법으로 숙성을 촉진시킨 효모구와 숙성구의 잎담배를 세밀히 조사하여 전기의 실험결과를 얻은 것이다. 그 개개의 실험결과를 이제 상세히 고찰하면 다음과 같다.

### 1. 잎담배의 색택 및 색소의 변화

잎담배의 색은 품질평가의 가장 중요한 항목의 하나로 되어 있다. 본 실험결과에서 잎담배 숙성에 따른 효모구와 숙성구의 색택에 관계가 있는 물리성의 변화를 고찰하면 일반적으로 미처리구와 비교하여 분광반사율, 자극순도, 명도는 발효일이 경과할수록 낮아지고 주재 파장은 낮아진다. 측정된 분광반사율은 대략 15일이 되면 그 값이 숙성구의 값과 비슷하게 된다. 명도는 25~30일이 되어야 효모구, 숙성구의 값이 숙성구의 값과 비슷하게 된다. 자극순도는 숙성 15일에 최고치를 갖게 되나 그치는 숙성구에 비하면 아직 낮다. 이러한 결과로 보아 효모구와 숙성구는 숙성구와 유사한 색택을 20일 내지 30일 숙성 시킴으로서 얻을 수 있다는 결론을 얻게 되었다. 이 결론은 색택과

관계가 있는 다른 실험결과들을 보아도 또 수궁할 수가 있다. 즉 효모구와 속성구의 polyphenol oxidase의 활성도가 속성후 15일~20일에 최소의치를 나타낸다는 사실, 잎담배의 일반 및 특수 화학성분의 함량이 15~30일이면 속성구의 것과 비슷하게 된다는 것 또 색소성분 잔량이 속성 20일만에 속성구의 것과 대략 같은량이 된다는 사실들은 다음에 말하는 바와같이 상기결론을 뒷받침하여 주는 결과인 것이다. 필자가 얻은 선택에 관한 상술한 여러물리성의 실험측정값들을 Okuma<sup>97,98</sup>가 얻은 결과와 비교하면 분광반사율 및 명도는 더 높았고 자극 순도는 낮았으며 주재파장은 비슷하였다. 또한 Nomura<sup>99</sup>가 15% 수분함량의 잎담배를 30°C에서 20일간 저장하여 얻은 실험결과와 비교하면 명도나 주재파장은 낮고 자극순도는 비슷하였다. 이같은 실험결과들 사이에 차이가 나타나는 원인은 아마도 공시 잎담배 품종이 다르기 때문이라고 추정된다. 특히 잎담배의 선택과 직접관계가 있는 잎담배의 발효속성에 따른 색소의 변동을 조사한 결과를 보면 다음과 같다. chlorophyll은 미처리, 효모, 속성구에 있어서 모두 그 잔량이 검출되지 않았다. 이는 다른 연구자들이 보고한바 음건 (shad curing)하는 동안에 chlorophyll 함량의 80~90%가 감소된다는 사실,<sup>100,101</sup> 잎담배가 발효하는 동안 chlorophyll이 거의 소멸된다는 보고 등<sup>102,103</sup>과 일치하는 것이다.

미처리, 효모, 속성, 속성구에 있어서의 황색계통의 색소인 xanthophyll, violaxanthine, carotene 등의 잔량은 미처리구를 제외한 다른 3구에 있어서는 다 줄고 있었는데 이는 과거의 보고<sup>104</sup>와 거의 일치한다. 특히 효모구는 속성구보다도 그 잔량이 더욱 적어져서 효모발효의 효과를 여기서도 입증하고 있다. 각색소별로 보면 xanthophyll은 효모구에서 carotene은 효모 및 속성구에서 각각 가장 많이 감소하고 있고 violaxanthine은 각 시료구에서 일률적으로 감소하고 있다. xanthophyll과 carotene의 양이 효모구에서 가장 심한 감소를 나타낸 원인은 현재로서는 분명치 않으나 현재까지는 색소의 변화는 효소의 작용에 의한다는 설이 가장 유력하므로 효모의 효소에 의한 것이 아닌가 생각된다. 일반적으로 polyphenol oxidase는 특히 이들 황색색소의 분해에 관여한다고 인정되고 있으니까 효모구의 polyphenol 활성도가 속성구의 것보다 높다는 것이 필자의 실험결과에도 나타난다 이 사실은 상기 추측을 뒷받침할 수 있을 것이다.

## 2. 발효에 따른 미생물의 변동

잎담배 발효속성에 따른 미생물 생균수의 변동을 보면 효모, 곰팡이 세균이 다 발효초기에 그수가 적었다가 발효가 진행됨에 따라 그중 세균이 급격히 증가하여 5일에는  $20 \times 10^6$ 에 도달하며 그 후는 완만히 감소하였다. 이는 필자<sup>46</sup> Jensen<sup>105</sup>과 Choman<sup>106</sup> 등이 발효중인 잎담배에 있어서는 초기에 소수의 미생물이 존재하다가 발효 5일에  $10^8$ 으로 세균이 급히늘어 그 다음 점차 감소한다고 보고한 사실과 일치한다. 곰팡이는 속성초기에 소수이었다가 속성이 진행됨에 따라 점차 증가하여 10일에는  $20 \sim 30 \times 10^6$ 이 되었다. 이같이 다수의 곰팡이가 생육한다는 것은 본 실험의 잎담배 발효조건 중 특히 온도, 습도 및 잎담배의 당함량등의 여러 조건이 이들 곰팡이의 번식에 적합하다는 것을 의미한다고 생각된다. Kobata<sup>100</sup> 등은 일본담배의 속성 저장중에 발생하는 *Aspergillus*, *Penicillium* 등의 곰팡류가 고온다습, 당함량이 높은 조건하에서 특히 번식하기 쉽다고 보고한바 있다. 전발효속성 기간을 통하여 잎담배 자체에 부착하고 있는 야생 효모는 발견하지 못하였다. 다만 잎담배에 분무하여 준 *Hansenula angusta* y-512만이 발효 15일까지 계속 그 수가 증가하다가 그 후 완만히 감소함을 볼 수 있었다. 효모구와 다른 시험구는 세균과 곰팡이의 수는 비슷하고 효모의 유무만이 다르므로 후기하는 바와같이 효모구의 여러 효소활성도가 타구에 비하여 높은 이유는 명백히 효모가 존재하기 때문이라고 생각된다. 필자가 실험한 온도 40°C 상대습도 74%의 속성조건 하에서는 상술한 바와 같이 세균, 효모가 다같이 왕성하게 생육할 수 있으며 곰팡이의 번식도 상당한 기한 억제할 수 있었으므로 이 조건은 속성에 대한 미생물의 효과면에 있어서도 적합한 조건이라고 생각된다.

## 3. 이화학적 성질의 변동

### (1) 물리성(팽창성 및 연소성)

잎담배의 품질을 결정하는 다른 2대특성은 껍미와 연소성이다. 그중 껍미는 잎담배의 여러화학성분에 의하여 영향을 받으며 연소성 팽창성과 밀접한 관계가 있고 팽창성은 잎담배 조직형태의 다공성, 당, 단백질 및 수지 기타 고분자 화합물의 질 및 량에 의하여 결정된다고 일반적으로 알려져 있다. 껍미와 연소성의 양부는 관능검사 결과와 같이 효모구와 속성구는 껍미 및 연소성이 속성구와 거의 대등하게 양호하다는 결과를 얻었다. 따라서 이두시험구에 있어서는 껍미와 연소성에

영향을 주는 여러 이화학적 성질이 숙성구의 것과 대동할 정도로 변화하였으리라는 것을 추측할 수 있다. 잎담배의 껍질의 향상과 관계가 있는 화학성분의 변화에 대하여는 Shmuk<sup>107)</sup> 및 Trifu<sup>108)</sup> 등은 환원당류의 증가로 인한 고분자탄수화물의 감소를 Tamaki<sup>109)</sup>는 단백질의 감소에 의한 저분자 질소화합물의 증가 기타 저급휘발성 유기산의 증가로 인한 방향성의 향상등을 보고한바 있는데 실제로 필자의 일반성분 분석표 및 각성분변화 결과표를 보아도 전질소단백질, alkaloid 류가 잎담배의 숙성발효에 따라 점차 그 함량이 줄고 총유기산량 ether 추출물, 휘발성유기산량이 증가하고 pH가 낮아지는 결과는 이같은 현상을 뒷받침 하여주는 것이라 생각된다.

## (2) 화학성분의 변화

잎담배의 발효숙성에 따른 개개 화학성분의 변화 양상 및 그 원인과 화학반응의 기구를 고찰하면 다음과 같다.

### 가. pH

잎담배의 pH 값은 숙성판단의 가장 손쉬운 지표로 되어있다. 본 실험결과에서 보면 잎담배의 숙성에 따라 계속 낮아져 30일에는 효모구와 숙성구의 것이 숙성구의 것과 같은 값을 나타내었다. 따라서 pH의 변화만을 보면 효모구와 숙성구는 30일동안 잎담배를 처리함으로써 2년동안 저장 숙성시킨 것과 같은 숙성효과를 보이고 있다. 발효숙성중 잎담배의 pH가 낮아지는 것은 본실험결과에서 보면 숙성에 따라 alkaloid 등이 염기성 화합물의 감소와 유기산 특히 휘발성유기산 증가 등을 생각할 수 있는데 Shmuk<sup>107)</sup> Tamaki<sup>108)</sup> Nisida<sup>110)</sup> 등도 그들의 연구에서 이점을 밝힌바 있다.

### 나. 당류

잎담배의 전 환원성물질, 전당 및 환원당은 발효숙성이 진행됨에 따라 전반적으로 감소하나 특히 효모구는 타구에 비하여 그 감소가 심하여 30일만에 효모구는 30% 숙성구는 16%가 소실되었다 효모구에 있어서 당류의 소실이 더 심한것은 효모에 의하여 소비되기 때문이라고 생각된다. 환원당의 소비량은 저장의 경우 20~30%, 인공발효의 경우(42~52°C 70~80% 관계습도에서 25일간) 20%라고 보고<sup>110)</sup>되어있으나 필자의 숙성구의 당의 소실량이 낮은것은 온도와 습도가 낮기 때문이라고 생각된다. 또 숙성에 따라 glucose, rhamnose 등 환원당의 감소와 더불어 휘발성 유기산의 증가를 보여주었는데 이는 당류의 일부가 휘발성 유기산으로 변화하는 것으로 생각되는데 실제로 당류가 소

실되는 원인에 대하여는 Nisida<sup>110)</sup> Takahashi<sup>112)</sup> 등은 당의 산화적분해에 의한 휘발성유기산으로의 전환 Arai<sup>106)</sup>는 당이 아미노산과 종합하여 Amadori 전의를 거쳐 잎담배의 향기에 기여하는 화합물을 생성하여 또 아미노산과 Maillard 반응으로 잎담배에 고분자 갈색중합물을 만든다고 보고된바 있다. 각개당류의 변화를 보면 sucrose가 효모, 숙성구에 있어서 효모구가 심한 감소를 보였는데 한편, glucose 및 rhamnose는 약간 감소하고 이에 반하여 maltose, raffinose 및 fructose는 오히려 증가하는 경향을 보였다.

Sucrose가 감소하는 동시에 fructose가 증가한 원인은 sucrose의 가수분해에 의한 것이라고 생각된다. Tamaki<sup>108)</sup> Nishida<sup>110)</sup> 및 Mikhailov<sup>113)</sup> 등도 이같은 사실을 보고 하였다. 다만 필자의 실험 결과에서 효모구가 숙성구에 비하여 sucrose가 더욱 많이 소모된 것은 가수분해에 의한 소비외에 효모에 의하여 더욱 많이 소모되기 때문이라고 생각된다. 한편 fructose는 증가하나 이와 반대로 glucose가 감소하는 원인에 대하여는 다음과 같은 이유들을 생각할 수 있다. 즉 일부 glucose의 fructose로의 전환, 상술한바 있는 아미노산과 glucose와의 반응, 잎담배중의 효소에 의한 당당류소비에 있어서 glucose가 fructose보다 더 많이 소비됨으로서 결과적으로 잎담배중의 glucose 풀은 fructose 풀보다 그 크기가 적다는 점 등이다.

### 다. 질소 화합물

전질소량은 잎담배 숙성중 별로 변동하지 않았으며 잎담배중의 전질소량은 잎담배를 건조할때까지는 25%가 감소하나 발효중에는 변동하지 않는다는 Vickery<sup>114)</sup> Jensen<sup>115)</sup> 등의 결과와 같았다.

총 단백질 함유량은 발효숙성에 따라 15일까지는 별 변동이 없었으나 30일까지에는 약간의 감소를 보였으며 효모구가 숙성구에 비하여 약간 감소하였다. 잎담배의 껍질을 향상시키는 발효숙성의 효과의 하나로서 Dorr<sup>116)</sup>는 단백질 함량의 감소를 Endeman<sup>117)</sup>과 Phillip<sup>35)</sup>은 단백질 특히 albumin의 분해를 들었는데 본 실험에서는 30일에 이르러서 약간의 단백질량의 감소를 나타내나 숙성중 단백질의 분해는 장기간이 걸리는 반응이라고 생각된다.

유리아미노산의 변동은 숙성구(20일)는 미처리구에 비하여 glycine, valine을 제외하고는 감소하였고 효모구(20일)는 미처리구에 비하여 그 함량이 상당히 증가 하였다. 효모구는 20일간의 숙성으로 아미노산 함량이 숙성구의 것과 같아짐으

로서 효모가 유리아미노산 함량을 증가시키는 역할을 한것이라고도 생각된다. 잎담배 숙성중의 여러 유리아미노산의 변화에 대하여는 Tomita<sup>94)</sup> Tamaki<sup>100)</sup> Giovannozzi<sup>111)</sup> Vickery<sup>114)</sup> 등의 보고가 있는데 그 종류나 변동량이 본 실험의 결과와 비슷하였다. 유리아미노산중 특히 변동이 심한것은 proline 과 cysteine 이다. proline 은 원래 잎담배에 함유된 유리아미노산 총량의 1/2-1/3을 차지하는 아미노산으로서 본 실험의 숙성구에서는 숙성초기에는 증가되다가 후기에는 감소하는 경향을 보여주고 있다. 또한 효모구에서는 계속 증가하나 숙성구보다는 그 함량이 적었다. 이 결과는 다른 연구자<sup>25,111)</sup> 들이 proline 은 잎담배 저장숙성중 그 량이 1/2-1/3로 준다는 보고와 일치 되었다. cysteine 은 효모구에서 숙성 20일만에 출현하였는데 이는 Giovannozzi<sup>118)</sup>의 Maryland 잎담배의 발효에 관한 연구에서 이러한 사실을 밝힌바 있다. 잎담배중의 아미노산의 종류 및 량은 잎담배의 향각미 및 선택과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는데 잎담배중의 아미노산은 전에 말한바와 같이 glucose 와 축합물을 만들고 이 축합물은 Amadori 전의를 거쳐 아미노당의 화합물을 만드는데 이 화합물은 열분해에 의하여 각 아미노산의 특유한 향기를 생성하여 담배의 향각미에 관여한다고 하였다. 또 아미노산은 glucose 와 Maillard 반응을 일으켜 갈색의 고분자 화합물을 만들어 잎담배의 선택에 영향을 주고 고분자 화합물량을 증가시킨다. Ranjan<sup>119)</sup> Frankenburg<sup>120)</sup>는 잎담배중의 유리아미노산량과 향각미는 정비례한다고 보고하였으며 Nagazawa<sup>121)</sup> Frankenburg<sup>122)</sup>는 잎담배의 정색물질이 아미노산과 polyphenol 의 종류와 량에 따라 달라진다고 보고한바 있다.

본 실험결과에서는 효모구가 숙성구보다 유리아미노산 함량이 많고 숙성구에 더욱 가까운 값을 보이고 있는데 관능검사에 의해서 효모구가 숙성구보다 좋다는 것은 이러한 점을 말하여 준다고 할 수 있다. 잎담배의 색, 아미노산 및 polyphenol 의 종류 및 함량들간의 관계를 가지고 논하기는 곤란하나 효모구, 숙성구의 아미노산 및 polyphenol 의 종류 함량 및 선택이 효모구의 그것들과 큰 차이가 없는 것으로 보아 상술한 상호관계를 수증할수는 있는 것 같다.

Alkaloids 중 특히 담배와 관계가 있는 nicotine 은 숙성중 그 함량이 점차 감소하였는데 이같은 사실은 다른 연구가<sup>21,25)</sup>들도 밝힌바 있으며 미생물의

산화분해를 받기 때문이라고 믿어지고 있다. 특히 nicotine 보다 nornicotine 이 더욱 현저하게 감소한 것은 nornicotine 이 nicotine 보다 화학적으로 불안정한 화합물이기 때문이라고 생각된다.

#### 라. 유기산

잎담배의 유기산은 그 전량이 비휘발성 유기산으로서 총유기산량의 변동은 비휘발성 유기산량의 변동이라고도 할 수 있는 것이다.

본 실험결과에서 비휘발성 유기산함량은 숙성 20일경에 최고치를 보였다가 그후 점차 감소하였다. Pyriki<sup>128)</sup>는 잎담배 발효에서 알카리분이 높아진다고 하였는데 본실험에서는 낮아졌는데 이는 발효가 진행되지 않았던것으로 생각된다. 비 휘발성 유기산의 변동중 미처리구가 숙성구보다 citric acid 함량이 적고 malic acid 함량이 많았다. 또한 효모구는 미처리구 보다 oxalic acid 함량이 많았다. 잎담배 숙성중 oxalic acid 의 변동에 대하여 Bacon<sup>187)</sup>, Haskins<sup>128)</sup> 등은 필자의 실험과 반대였으나 오히려 Pyriki<sup>120)</sup>는 발효가 진행되면 oxalic acid 는 증가한다고 하였는데 본 실험에서와 같게 나타났다. 이상으로 보아 효모구는 발효조건이 퇴적발효의 효과를 얻을수 있는 것이 아닌가 생각된다.

유기산중 그 함량은 적으나 심한 변동을 보인것은 휘발성 유기산이었다. Nishida<sup>110)</sup> Shmuk<sup>107)</sup> 등 다른 연구자들도 이와 일치하는 결과를 보고하였다. 특히 본실험에 사용한 온도와 습도의 조건은 휘발성 유기산의 증가를 촉진시킬 수 있는 상태임은 분명하다.

Takahashi 등<sup>112)</sup>도 본 실험의 경우와 같은 온도 및 수분 조건으로서 휘발성 산량의 증가에 가장 좋은 결과를 얻었다.

본 실험에서 효모구가 숙성구에 비하여 휘발성 유기산이 더 많이 생성된 것은 효모구가 다른구에 비하여 환원당의 손실이 많은 것으로 미루어 보아 효모에 의하여 당대사가 촉진된 것이 아닌가 생각된다. 잎담배 숙성중의 휘발성 유기산의 증가 원인에 대하여서는 정설은 없으나 Toyoda<sup>126,127)</sup> 및 Riburde<sup>128)</sup>들은 잎담배의 분석시험 및 C<sup>14</sup>-glucose 를 사용한 연구에서 가용성 질소화합물의 탈 아미노반응 및 당의 산화 분해를 주장하였고, Dixon<sup>21)</sup>은 비휘발성 유기산의 산화 개열반응을 보고한 바있다.

#### 마. Polyphenol

Polyphenol 화합물은 잎담배의 색체와 향각미에 직접 관계가 있는 화합물로서 잎담배의 품질에는

영향을 주는 것으로 인정되고 있다. Shmuk<sup>42)</sup>는 잎담배 품질의 화학적 기준으로서 polyphenol index 를 주장 한바 있다. 본 실험결과를 보면 rutin 및 chlorogenic acid 가 다 발효속성이 진행됨에 따라 그 함량이 줄었고 미처리구가 다른 처리구 보다 그 함량이 많은 것을 알 수 있었다. chlorogenic acid 는 Weaving<sup>120)</sup> Frankenburg<sup>45,130)</sup> 및 Phillips<sup>131)</sup>에 의하여 미국 Flue-cured 담배에서 처음 검출된바 있는데 본 실험에서도 볼 수 있었다. 이들은 잎담배속성중 정색물질로 산화된단단지 아미노산 알카로이드 등과 결합하여 정색물질을 만든다든지 산화분해후 chlorophyll 유도체와 결합하여 고분자물질을 만들어 갈색을 나타내는 등 잎담배 색택에 관여하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 잎담배 속성중 이들과합물의 감소와 색택의 발전이 병행하는 실험결과는 이러한 면을 말하여 주는 것이라 생각된다. 즉 Loew<sup>11)</sup>는 잎담배 속성중 색택의 변화를 polyphenol 의 산화, Mason<sup>132)</sup>은 rutin 의 효소적 산화로 설명하였고 Frankenberg<sup>45,130)</sup> Dorr<sup>116)</sup> 등은 polyphenol 과 아미노산의 결합이 색과 향각미에 영향을 주며 alkaloid 및 chlorophyll 유도체와의 결합이 정색물질을 만든다고 보고하였다.

#### 4. 잎담배 발효속성의 생화학

잎담배는 발효속성중 잎에 함유된 효소 및 발효 미생물이 생산한 효소의 작용을 받는다고 인정되고 있다. 이러한 생화학적 면에서 필자의 실험결과를 고찰하면 다음과 같다.

##### (1) 발효속성에 따른 산소 흡수량

잎담배의 발효와 산소흡수량 사이에는 밀접한 관계가 있다. 이 사실은 Giovannozzi<sup>34)</sup> 및 Phillip<sup>35)</sup>가 처음 발견한것으로서 그후 Givonnozzi<sup>34)</sup>는 산소흡수량을 잎담배 발효진전의 지수로 하기를 제안하였고 Bobier-Iepigre 발효법<sup>23)</sup>에 있어서는 산소흡수량이 발효지수로서 사용되겠끔 진전되어 왔다. 본 실험에서는 미처리구의 잎담배가 280ml/g/hr 의 산소흡수량을 보이는 것이 속성 20일만에 효모구와 속성구가 다같이 80~90 $\mu$ l/g/hr 로 떨어지고 그후 계속 서서히 줄었다. 잎담배의 속성진전에 따라 산소흡수량이 감소하는 것은 다른 연구자들도 모두 인정하고 있는 사실로서 Noguchi<sup>25)</sup>는 40°C, 50% 관계 습도에서 4~6개월에 2년 숙성품과 같은 정도로 줄어든다고 보고하였다. 본 실험 결과에서는 산소 흡수량의 감소가 상기 Noguchi<sup>25)</sup>의 결과보다 더욱 단시간내에 일어난 것은 필자의 실험조건(40°C, 74% 관계습도)중 상대습도가 높기 때문에 속성의 진행속도가 지극히 촉진된 것이 아닌

가 생각된다. 흡수된 산소가 polyphenol oxidase, peroxidase 등의 효소작용으로 polyphenol 의 산화에 사용된다고 생각하면 상기효소들의 활성도의 약화 polyphenol 의 소실 및 산소흡수량의 저하가 병행한다는 사실은 잘 설명이 된다. polyphenol 류의 산화소실이 잎담배 속성지후를 추적하는 한지표가 되고 있는 것은 상술한 이유때문으로 생각한다.

##### (2) 여러가지효소의 활성도

잎담배 속성에 관여하는 효소는 잎담배 자체내의 것과 미생물에서 유래한 것과 두 종류가 있는 것으로 이들 두군의 효소는 잎담배의 발효속성에 있어서의 여러화학변화에 관여하여 제품의 색택과 향각미의 조성에 큰 역할을 한다고 한다. 이미 상술한 여러 화학성분의 변동도 효소작용에 의한 것이 많다. 잎담배의 속성에 관여하는 효소들은 또한 산화효소와 가수분해 효소의 둘로 나눌 수 있는데 산화효소는 polyphenol oxidase, peroxidase 및 catalase 로서 특히 polyphenol 류의 산화에 관여하여 연초의 색택등 외관상의 속성의 조성에 큰 역할을 한다고 본다. 가수분해 효소는 amylase, invertase 로서 잎담배의 향각미성분을 조성하는 역할을 하는것으로 본다.

잎담배 발효속성에 따른 각효소활성도의 변화를 보면 polyphenol oxidase 는 발효속성이 진행됨에 따라 다른 연구자<sup>133,134,135)</sup>들도 보고한바와 같이 계속 그 활성이 약화되어 chlorogeine acid 등의 o-diphenol 류를 산화하여 quinone 형 화합물로 산화시켜 잎담배에 갈변현상을 이끄는 동시에 lignin, tannin, catechin, 등도 산화 분해시켜 향기성분을 생산하여 잎담배의 향각미에 중요한 역할을 하는 것은 확실하다. 이 polyphenol oxidase 와 같은 역할을 하는 peroxidase 는 발효기간을 통하여 그 활성도가 별로 변하지 않는데 그 이유는 현재로서는 분명치 않으나 이 효소의 안정성에 기인한다고 밖에 생각할 수 없다. peroxidase 는 Frankenberg<sup>136,137)</sup>에 의하면 phenol 류 외에 alkaloid 인 nicotine 의 산화에도 관여한다고 하는데 본 실험에서는 그 활성도가 안정한것으로 보아 그러한 작용을 할 것이라고 생각이 된다.  $\alpha$ -amylase 는 속성중 계속 감소하는데 반하여  $\beta$ -amylase 는 속성 10일부터 20일까지는 증가하였다가 그후 약화되어가는데 그중  $\beta$ -amylase 가 20일까지 증가하는 것은 미생물의 증식에 의하는 것이라고 생각된다. Frankenburg<sup>138)</sup>도 잎담배중의 효소활성도에 관한 연구보고에서 발효중의 잎담배의 효소작용은 잎담배자체의 효소보다는

외부에서는, 즉 미생물의 효소에 의한 작용이 더 크다는 점을 지적하고 있다.

다만  $\alpha$ -amylase는  $\beta$ -amylase하고 달리 계속 감소하는 결과를 보인것은 잎담배 발효에 관여하는 미생물의  $\alpha$ -amylase 생성율이  $\beta$ -amylase 생성율보다 심히 약한것이라고 생각할수밖에 없다.

Invertase와 catalase는 숙성 10일까지는 효소활성도가 약해지다가 다시 높아지며 20일경에 최고에 달한 후 다시 약화하는 결과를 보여주었는데 이것은 잎담배중에 존재하는 효소의 활성도가 자연 약화되어가다가 10일 이후 미생물의 급격한 증가로 인하여 미생물이 생산한 이들 효소때문에 활성도가 급증하였다. 다시 이들의 쇠퇴하는것이라고 생각이 된다. 특히 catalase의 활성도의 변화에서 보면 효모구가 숙성구에 비하여 이같은 경향이 두드러지게 나타나고 있는 사실은 더욱 뚜렷하게 이것을 뒷바침 하는 것으로 볼 수 있다. 전반적으로는 모든 효소에 있어서 효모구의 효소활성도가 숙성구의 그것보다 강한것은 효모가 생산하는 이들 효소들의 작용에 의한 것이 아닌가 생각된다.

### 5. 발효속성 잎담배의 품질평가

잎담배중의 화학성분의 상호관계에서 품질을 표현하고져 옛부터 여러 품질 계수가 제시되어왔다.

그중 황색종 L.colored grade에 적합하다는 Phillips<sup>181</sup> 등의 결과를 참고하여 4개의 Shumuk<sup>91</sup> 계수, Kovalenko, Pyriki,<sup>42</sup> Phillips<sup>181</sup> 및 Brückner<sup>43</sup>의 품질 계수를 적용한 바, 탄수화물과 질소화합물들의 비인 4개의 Shmuck 계수 및 Kovalenko의 계수는 잘 적합하였으며 Shmuck, Pyriki의 Polyphenol 계수도 잘 적합하였고, Pyriki의 품질계수는 경향은 같으나 잘맞지는 않았으며, Phillips 및 Brückner의 상세한 품질계수들은 적합하지 않았다. 엽연초 발효 숙성중에는 화학성분의 변화가 급격치 않으므로 시료등의 차이에서 오는 영향도 있을것 같다.

관능검사는 전문가로 하여금 객연실에서 실시한 수치의 평균이며 숙성구, 효모구, 숙성구, 미치리구의 순이었다. 일반적으로 발효숙성품은 미치리구보다 연소성, 완화성, 향기, 깍미가 향상되었다.

### 적 요

황색종 잎담배의 인공발효속성은 효모처리에 의한 인공발효, 단순한 인공숙성, 2년 저장숙성 및

미치리구로 나누어 미생물학, 물리학, 화학, 생화학적으로 그 변화과정을 종합적으로 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한국산 잎담배 Y.S.A의 발효속성을 촉진시키는 최적 조건으로서는 잎담배를 온도 40°C 평형 함수율 18%, 관계습도 74%에 놓아두는 것이 잎담배의 모든 품질적 특성에 가장 양호한 결과를 주는 것임을 알게되었다.

2. 잎담배를 40°C의 숙성온도 및 74%의 상대습도에서 효모를 첨가하여 약 20일 내외에서 숙성을 촉진시켜 숙성시키면 잎담배의 여러가지 물리적 및 화학적 특성이 1년 및 2년 저장숙성시킨 것과 비슷하게 됨을 알게 되었으므로 그 실용적 효과를 입증할 수 있었다.

3. 온도 40°C와 평형 함수율 18%의 숙성조건하에서 잎담배에 효모를 첨가하여 또는 단순히 조기숙성시켰을 때 잎담배는 그 숙성에 필요한 물리화학적 특성은 약 20일만에 얻을 수 있다는 것을 알게 되었다.

4. 본 실험에서 잎담배의 발효숙성기간중 미생물의 동태는 효모와 세균은 15일까지 증가하였다가 감소하였고 곰팡이류는 끝까지 계속 증가하였다.

5. 효모구 및 숙성구 잎담배의 이화학성은 발효숙성이 15~20일 진행함에 따라 pH는 저하하였고 팽승성과 연소성이 양호하여 졌고 자극순도, 명도 주재파장등 색택에 관련되는 물리성이 2년저장 잎담배와 비동하여졌다. 또 총환원성물질, 전당, 전환원당, 알카로이드량은 감소하였고 유기산, ether 추출물은 증가, 전질소 및 단백질량, 조섬유, 회분등은 별 변화가 없었다.

6. 효모 및 숙성구의 잎담배는 발효숙성이 15-30일 진행되는 동안 그 개개의 화학성분이 다음과 같이 변화하였다.

즉, 시일이 경과함에 따라  
당 류—sucrose, rhamnose, glucose  
색소류—chlorophyll, carotenes, xanthophyll, violaxanthine  
polyphenols—rutin, chlorogenic 및 caffeic acid  
유기산—iso-butylic, crotonic, capronic, galacturonic, tartaric, succinic, citric acid  
알카로이드—nicotine, nornicotine 등 화합물은 감소하였다.

한편 시일이 경과함에 따라  
당 류—fructose, maltose, raffinose



아미노산—proline, cystine,

유기산—formic, acetic, propionic, malic, oxalic, malonic,  $\alpha$ -ketoglutaric, fumaric, glutaric acid 등 화합물은 증가하였다.

7. 잎담배 발효숙성중 생화학적 특성의 변화는 다음과 같았다. 즉, 30일간의 발효숙성기간중 산소흡수량은 점차 감소하였으며,  $\alpha$ -amylase  $\beta$ -amylase, 활성도는 점차 약하여 졌으나 catalase, invertase는 그 활성도가 일단 숙성중기에 높아졌다가 낮아졌다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Koller, J.B.C, Der Tabak in naturwissenschaftlicher, landwirtschaftlicher und technischer Beziehung. Augsburg. (1858)
- 2) Schlösing, T., Mem. Manufact. de l'état Tabacs. 1, 515 (1888)
- 3) Behrens, J., Landw. Vers. Sta., 43, 291 (1894)
- 4) McKinstry, D.W., et al, J.Bact., 35, 71 (1938)
- 5) Köning, C.J., De Natur, Tijdschr. voor toepaste scheikunde en hygiene, Deel I. 1897 De Tabak, Amsterdam and Leipzig (1900)
- 6) Mosca, T.F., Gazz. Chim. ital., 43, 428 (1931)
- 7) Schmidt, J.J., TROPENFLANZER, 25, 64 (1925)
- 8) Joergensen, A.C.P., Microorganisms and Fermentation. London (1925)
- 9) Johnson, J., J.Agr. Research, 49, 137 (1934)
- 10) Naghski, J., et al., Ind. Eng. Chem., 36, 556 (1944)
- 11) Loew, O., U.S. Dept. Agr. Bull., No. 59 (1899)
- 12) Kolenev, A.H., Pub. State Inst. Tabacco Invest. Krasnodar, U.S.S.R Bull. No. 5 (1917)
- 13) Smirnov, A.I., ibid., Bull No. 39 (1927)
- 14) Smirnov, A.L., Physiological-Biochemical Principles of Tobacco. Krasnodar U.S.S.R., (1933)
- 15) Kissling, R., Tabakskunde, Tabaksbau und Tabakfabrikation Berlin, (1925)
- 16) Jensen, H., Centr. Bakt., 21, 469 (1903)
- 17) Jensen, H., Mededeel Preefsta. Vorstenland. Tabak. 12, 22 (1915)
- 18) Petrenko, A.G. et al., VITIM, 150. (1958) (on cours d'impression)
- 19) Volgunvo. C.D. et al., VITIM 4 (1958)
- 20) Boekhout, F.W.J., et al., Centr. Bakt., 24, 496 (1909)
- 21) Dixon, L.F., et al., Ind. Eng. Chem. 28, 180 (1936)
- 22) Darkis, F.K. et al., I&E Chem. 44, 284 (1952)
- 23) Rollin, M.L., La pratique de la fermentation pré-accélérée Rev. Int. des. Tabacs, 292 (1952)
- 24) 박희조 이계목, 연초연구 1, 67 (1958)
- 25) Noguchi, M., Jap. Monop. Corp. Central Res. Inst. Sci. Paper 109, 10 (1967)
- 26) Tisnes, P.J., Ann. Inst. Ext. du Tabac. Bergerac, II. 2 (1955)
- 27) Enders and Windish., Biochem 318, 54 (1944)
- 28) Wada, E., Arch. Biochem, Biophys 64 (1956)
- 29) Steadman R. L., Tabacco U.S.A. 145, 15 (1957)
- 30) Frankenburg, W.G., et al., Abs. of Pap. presidentad before the 9th Annual Tabacco Chemist. Conference (1955)
- 31) Remenschneider, R.W. et al., Oil & Soap 22, 120 (1945)
- 32) Venratarao, C. et al., Indian Chem. Soc. 21, 249 (1944)
- 33) Sabeay, s., et al., Compt. rend 225, 887 (1947)
- 34) Giovannozzi, M., Suifattori determinantie influenzanti la formentazione dei tabacchi. 11 Tabacco. Roma, 618 (1951)
- 35) Philipp, W., Der Zustand des Tabaks vor und nach der Fermentation und Moglich Keiten zu dessen Kontrolle. Ber. Inst. Tabakforsch. Dresden. 4, H.2. (1957)
- 36) Pyriki, C., Erkenntnisse auf dem Gebiet der Tabakfermentation Ber. d. Inst. Tabakforsch, Dresden2, H.S. 66, (1955)
- 37) Weybrew, J.A., North Carolina State College-School of Agriculture-Raleigh. Communication pour la redaction de ce rapport (1958)
- 38) Toyoda, I., et al., Sci. Pap. Centr. Res. Inst. Japan Monop. Corp. 96, 1 (1956)
- 39) Alcaraz-Mira E., Tabaco Sevilla (1956)
- 40) Iijin G.S., Tabak U.S.S.R. 18, 1 (1957)
- 41) Grob. K., Die Tabak-Zeitung 39, 28, September (1956)
- 42) Schmuck, A.A., State Inst. for Tabacco Inve

- stigatins, Krosmodar, Bull, 69, 7 (1930)
- 43) Bruückner. H., Die Biochemie des Tabaks Verlags buchhaudlung pane parline (1936)
  - 44) Pyriki, C., CORESTA 58, (1958)
  - 45) Frankenburg, W.G., Advances. in Enzynology, 10, 325 (1946)
  - 46) Giovanozzi, M., Actes deuxieme congress, Scientifique international du tabac 605 (1958)
  - 47) Bae, H.W., J. Agr. Chem Soci Korea 7, 53 (1966)
  - 48) Bae, H.W., ibid 8, 75 (1967)
  - 49) 배효원, 수연(전매연구보고) 10, 23 (1969)
  - 50) Bae, H.W., J. Agr. Chem Soc Korea 12, 107 (1969)
  - 51) 김재훈, 정현순, 박찬홍, 수연(전매연구보고) 8, 48 (1966)
  - 52) Microbiology Hand Book *Gihodo, Japan* 988, (1957)
  - 53) Lee, G.H., J. Agr. Chem, Soc, Korea 11, 4 (1969)
  - 54) Hirota T., at al., Ferment. Soci Paper Japan 39.1 (1961)
  - 55) Izawa M.O., Jap. Monop. corp, cet, Res, Inst, S. G., Paper 86 (1961)
  - 56) Kobata S.R., Monop. Cent Res. Inst. Sei. Paper 25 (1956)
  - 57) Color Sci edit., Color-Science Japan 194, (1966)
  - 58) Tokyo univ., Exp. Agr. chem, Japan (1956)
  - 59) CORESTA Standard Method (1966)
  - 60) 연초재료품 및 공정분석법(전매청) (1967)
  - 61) Shmuck, A.A., chemistry & technology of
  - 62) Winter stein., Hoppe Seyler. 220, 263 (1924)
  - 63) Zechmister J.B. chem. Vol 144(1942)  
Tobacco Vol Ⅲ 100 (1953)
  - 64) Snell & Snell., Colorimetric Method of Analysis Ⅲ D. Vannos trand Co. (1961)
  - 65) Laidlaw R.A et al., J. Sci Focd Agri 3.19 (1952)
  - 66) Partridge. S.M., Nature 158, 270 (1947)
  - 67) Nara S.Z., J.Agr. Chem Soc. Japan 33, 1072 (1959)
  - 68) Himes, J.B.et.al., Anal. Chem. 33, 364 (1961)
  - 69) Bulen, Anal, chem 24, 187 (1952)
  - 70) Uritani Y.J., Agr, chem, Soc Japan 26, 287 (1952)
  - 71) Akaike, S Hatano Tob Exptl. Station, Japan, Spec, Bull 7 (1955)
  - 72) Warick R.P et al., plant physiol 44, 573 (1966)
  - 73) Frank, E. et al., Anal, Chem, 27, 928 (1955)
  - 74) Forrest, G., Houston Anal. Chem. 24, 415 (1952)
  - 75) Wada, E. et. al., J. Agr. Chem Soc. Japan 27, 561, (1953)
  - 76) 최영현 박근창, 수연(전매연구보고) 8, 5 (1966)
  - 77) Block, R.J. et.al., Paper Chromatograhly and Paper Eletrophoresis 2nd ed. 231, (1958) Academic Press
  - 78) Satake, K., Chromatography 96 (1961)
  - 79) Kaburaki, Y. et al., J. chem Soc Japan, 86, 1035 (1962)
  - 80) Schmelts. I., J. Asoc, of Agr. chem 46, 779 (1963)
  - 81) Met. Calfe L.D et al., Anal, Chem, 33, 363 (1961)
  - 82) 최영현, 수연(전매연구보고) 9 (1968)
  - 83) Bartsch, R.C. et al., Anal Chem 32, 1101 (1960)
  - 84) Hornstein I. et al., Anal chem 32, 540 (1960)
  - 85) Simmond M.L. et. al Anal, Chem, 33, 1512 (1961)
  - 86) Bowen & Barthel., Tobacco Reprint No. 1, 74 (1953)
  - 87) Grriffith L.B. et al., Science 121, 343 (1955)
  - 88) Kobashi, Y., Monop Central Res Inst Sci Paper 108, 237 (1966)
  - 89) Fuwa, H.J., Biochem 41, 5 (1954)
  - 90) Somogyi M., J. Biochem 195, 19 (1952)
  - 91) Euler & K., Tosephson Ber. 56, 1749 (1928)
  - 92) Akabori, S., KOSO KENKYUHO, Tokyo 337 (1967)
  - 93) Adams. M., et al., J. Am. Chem, Soc 60, 2474 (1938)
  - 94) Tomita, H., et al J. Agr. Chem. Soc. Japan 36, 704 (1962)
  - 95) Kataoka S., HATABAKO KENKYU 32, 57 (1963)
  - 96) Arai. T., KAGAKU TO SEIBUTSU 7, 143 (1969)
  - 97) Okmna. K., Hatano Tobacco. Exp. Sta. Japan 36, 43 (1952)

- 98) Okuma, K., Hatano Tobacco Exp. Sta Japan  
39, 83 (1956)
- 99) Nomura, M., HATABAKO KENKYU 253  
(1953)
- 100) Evans. H.J. et al., Soil Sci. Soc. Am 12, 315  
(1947)
- 101) Griffith, R.B., et al., Ind. Eng. Chem, Anal,  
Ed 16, 438 (1944)
- 102) Barta, L. et al., Undersuch, Lebensm, 76,  
358 (1938)
- 103) Bodnar. J. et al., Enzymforsch. 4, 274 (1935)
- 104) Wall. M.E., Ind. Eng. Chem. 41, 1465  
(1949)
- 105) Choman, B.R. et al., Abdel-Ghoffar: Bacterial  
Proco 5421, (1954)
- 106) Kobata, J, et. al., Jap. Monop. Corp. Cent.  
Res. Inst. Sci. Paper 96 (1956)
- 107) Shmuck., The Chemistry and Technology of  
Tobacco Vol Fibu III (1953)
- 108) Trifu, I.S., Inst. Cercet, alim Bucurest 1, 145  
(1957)
- 109) Tamaki, E., 4th T.Sci Cong 323, (1966)
- 110) Nishida, K., HATABAKO KENKYU 49, 51  
(1968)
- 111) Giovannozzi, M., Tobacco 59, 335 (1955)
- 112) Takahashi, K., Jap. Monop. Corp, Cent.  
Res. Inst. Sci. Paper 107, 69 (1965)
- 113) Mikhailov. M.K., C.R., Acad. Bulg. Sci.  
10, 201 (1957)
- 114) Vickery al Carnegie Inst. Washington Pubi  
445 (1933)
- 115) Jensen. C.D. Ind. Eng. Chem. 44, 306  
(1952)
- 116) Doer Tabak-Z 50, (1956)
- 117) Endemann. W., Inst Tabakforsch Dresden.  
Ber. 2, 1. 23-9 (1955)
- 118) Givannozzi et. al., Tobacco (Italian) 61, 681  
(1956)
- 119) Ranjan. S. et al., Nature, 4501, 235 (1956)
- 120) Frankenburg, W.G., Tobacco (U.S.A) 142,  
1310 (1956)
- 121) Nagasawa, M. Jop. Monop.at. Corp. Cent.  
Res. Inst. Sci. Paper at. al., 96, 50, (1956)
- 122) Frankenberg. W.G. et al., Ind. Eng. Chem.  
44, 301 (1952)
- 123) Pyriki, C., Ber. Inst Tabak. forsch. Dresden  
4.181 (1957)
- 124) Bacon et al., Ind. & Engin. Chem., 269. 970  
(1934)
- 125) Haskins. Aol. Thesis, Penna. State College  
(1944)
- 126) Toyada, I. at. al., Jap. Monop Corp Central  
Res Inst Sci Paper 85.1 (1953)
- 127) Toyoda, I. at. al., Jap Monop Corp Central  
Res Inst Sci Paper 96.1 (1956)
- 128) Riburde et al., TobacIo Sci 8,70 (1964)
- 129) Weaving, A.S., Tobacco Science 1, 65 (1953)
- 130) Frankenburg W.G., Advances, in Enzyno  
logy 6, 309 (1946)
- 131) Pililips., R.J.: Association of Dfficial Agric-  
ultural Chemists 38. 835 (1955)
- 132) H.S. Mason, Adv. Enzymol 6,105 (1955)
- 133) Tomita. H., J. Agr. Chem Soc Japan, 35,  
405 (1961)
- 134) Yunoshev. V.K., pischvevaya Tekhnol No5,  
97 (1960) CA. 54, 25599 (1960)
- 135) Zelitch, I., et. al., plant physiol 33, 151 (1958)
- 136) Frankenburg, W.G. et al., Biochem. Biophys:  
58, 509 (1655)
- 137) Franuenburg, W.G. at al., J. Am Chem Sec  
77, 5730 (1955)